

Doseamento de hidratos de carbono em abóbora manteiga (*Cucurbita moschata*)

Mariana Vieira Rocha Melro Petrica

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica

Orientador: Doutora Mariana da Silva Gomes Mota

Júri:

Presidente: Doutora Cristina Maria Simões de Oliveira, Professora Associada com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor João Carlos da Silva Dias, Professor Associado com Agregação do Instituto Superior de Agronomia;
Doutora Mariana da Silva Gomes Mota, Técnica Superior do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora.

AGRADECIMENTOS

À Professora Mariana Mota por ter estado sempre disponível e sempre a acompanhar de perto todo o desenvolvimento da dissertação, pelo apoio e pelo esforço incansável.

Aos meus pais por terem permitido todo este percurso académico e por tornarem possível todas as conquistas que adquiri até hoje.

À Rita, à Mafalda e ao João por estarem sempre por perto e pela motivação nos momentos de maior pressão.

D. Nídia, D. Luísa e colegas de laboratório por terem disponibilizado a sua pronta ajuda durante a realização das análises das amostras e todo o trabalho de laboratório.

Obrigada por estarem presentes e tornarem esta dissertação possível.

RESUMO

Esta dissertação teve como principal objetivo a determinação dos teores de açúcares simples, de amido e de matéria seca (MS) em abóboras manteiga colhidas em cinco datas da campanha de 2016 em diferentes campos/condicionalismos de produção (Casével, S. Manços e Couço), para definir a data de colheita ideal para obter uma abóbora com elevado teor de MS e teores de amido (relação com textura) e de açúcares simples (relação com sabor doce) adequados à alimentação infantil, o destino destes frutos. Adicionalmente, procurou-se adaptar um método expedito, o doseamento com recurso à antrona, a este contexto, visando obter resultados equivalentes de uma forma mais simples e rápida. Nas diferentes amostras, a MS foi determinada por secagem a 100°C, o teor de açúcares simples por refratometria e o teor de amido por digestão com amilase. Na tentativa de implementar um procedimento globalmente mais expedito que o referido, as amostras provenientes de Casével foram também analisadas pelo método da antrona. Os resultados revelaram que a MS aumentou numa fase inicial da maturação (até meados de setembro, até aproximadamente 17% nas abóboras de Casével), diminuindo depois durante a restante maturação e armazenamento (até cerca de 10-12%), que o teor de amido diminuiu (de 12% a 2% na MS) e que os açúcares simples aumentaram (de 20% a 39% na MS) ao longo de toda a maturação e armazenamento. Os locais/condições de produção não influenciaram de forma significativamente coerente estes parâmetros. O método da antrona assim aplicado revelou não ser adequado para o doseamento de açúcares complexos e/ou totais, provavelmente por ineficácia da hidrólise ácida rápida que o precedeu. No entanto, este método revelou utilidade para a deteção de açúcares simples em relação à refratometria, uma vez que podem existir oligossacáridos que esta não deteta e tem um limiar de deteção muito mais interessante.

Palavras-chave: Antrona, Amido, Açúcares Simples, Abóbora Manteiga.

Quantification of carbohydrates in butternut squash (*Cucurbita moschata*)

ABSTRACT

The main goal of this dissertation was to determine the levels of simple sugars, starch and dry matter (DM) in butternut squash harvested on five dates of the 2016 season in different fields /production conditions (Casével, S. Manços and Couço), to determine the ideal harvest date to obtain a squash with high DM content and starch (texture) and simple sugars (sweet flavor) suitable for babyfood, the destination of these fruits. In addition, a fast method, anthrone detection, was assayed in this context aiming to achieve equivalent results in a simpler and faster way. In the different samples, DM was determined by drying at 100° C, simple sugars content by refractometry and the starch content by amylase digestion. In an attempt to implement a generally easier procedure than the one referred, the samples from Casével were also analyzed by the anthrone method. The results showed that DM increased at an initial stage of maturation (until mid-September, up to approximately 17% in squashes from Casével), then decreased during the remaining maturation and storage (to about 10-12%); the starch content decreased (from 12% to 2% in DM) and the simple sugars increased (from 20% to 39% in DM) throughout the maturation and storage. The sites / production conditions did not significantly and coherently influence these parameters. The anthrone method in this adaptation showed not to be suitable for the determination of complex and / or total sugars, probably because of the inefficiency of the rapid acid hydrolysis that preceded it. However, this method seemed to be useful for the detection of simple sugars relatively to refractometry, since there may be oligosaccharides which refractometry does not detect and anthrone has a much more interesting detection threshold.

Keywords: Anthrone, Butternut Squash, Simple Sugars, Starch.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Características gerais da abóbora	3
2.1.1. Enquadramento taxonómico	3
2.1.2. Origem e expansão.....	3
2.1.3. Cultura da abóbora no mundo e em Portugal.....	4
2.1.4. Morfologia	7
2.1.5. Condições edafo-climáticas ideais para o desenvolvimento da cultura	8
2.2. Etapas fisiológicas de crescimento e desenvolvimento	9
2.2.1. Polinização, fertilização e frutificação.....	9
2.2.2. Maturação e colheita.....	10
2.2.3. Pós-colheita e senescência.....	10
2.3. Hidratos de carbono na abóbora.....	11
2.3.2. Classificação.....	11
2.3.3. Hidratos de carbono mais relevantes	12
2.3.4. Metabolismo dos hidratos de carbono.....	16
2.3.4.1. Metabolismo na germinação das sementes	17
2.3.4.2. Metabolismo dos hidratos de carbono nas folhas.....	17
2.3.4.3. Metabolismo dos hidratos de carbono nos frutos	18
2.4. Métodos de doseamento de hidratos de carbono.....	19
2.4.1. Introdução.....	19
2.4.2. Extração e determinação de açúcares simples	19
2.4.2.1. Doseamento de açúcares solúveis com recurso a refratometria	20
2.4.2.2. Deteção de açúcares com recurso a antrona	20
2.4.3. Determinação do teor de amido	21
2.4.3.1. Determinação do teor de amido por hidrólise ácida.....	21
2.4.3.2. Determinação do teor de amido com recurso a alfa-amilase e amiloglucosidase.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23

3.1. Introdução.....	23
3.2. Reagentes utilizados.....	23
3.3. Equipamentos utilizados	23
3.4. Origem e caracterização do material vegetal	24
3.5. Recolha e preparação das amostras.....	24
3.5. Extração de hidratos de carbono a partir do material seco.....	25
3.5.1. Extração de açúcares simples para os métodos da deteção do amido por digestão com amílase e da refratometria	25
3.5.2 Extração de frações separadas de hidratos de carbono para a deteção pelo método da antrona	25
3.6. Determinação dos açúcares simples por refratometria.....	26
3.7. Deteção de amido por digestão da amílase	26
3.8. Deteção com recurso a antrona	27
3.9. Tratamento de dados	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Doseamento de hidratos de carbono nos frutos de abóbora de diferentes campos e em diferentes datas	30
4.1.1. Análise dos resultados obtidos para as datas 1, 2 e 3 e nos campos 17 e 18.....	30
4.1.2. Análise dos resultados obtidos para as datas 2 e 3 nos campos 17, 18 e 19.....	32
4.1.3. Análise dos resultados estatísticos obtidos para os campos 19	35
4.2. Doseamento de açúcares pelo método da antrona	37
4.2.1. Curva de calibração para o método da antrona.....	37
4.2.2. Deteção dos hidratos de carbono pelo método da antrona	38
4.3. Comparação entre métodos.....	39
4.3.1. Comparação dos valores de açúcares simples obtidos.....	40
4.3.2. Comparação entre os valores de açúcares complexos obtidos.....	41
4.3.3. Açúcares totais	42
5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	43
6. BIBLIOGRAFIA	46
7. WEBGRAFIA.....	50

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Temperaturas cardinais para as Cucurbita spp (adaptado de Almeida, 2006).	8
Quadro 2 - Teores médios de matéria seca, amido e açúcares simples nos campos 17 e 18, nas datas 1, 2 e 3.....	30
Quadro 3 - Teores médios de matéria seca, amido e açúcares simples nos campos 17 e 18 em função do método de produção e do campo nas datas 1, 2 e 3.....	31
<i>Quadro 4 – Teores médios de matéria seca, amido e açúcares simples para as datas 1, 2 e 3 nos campos 17 e 18.sujeitos às diferentes modalidades (n=3).....</i>	<i>32</i>
Quadro 5 -Influência da data no teor médio de matéria seca, amido e açúcares simples os campos 17, 18 e 19.....	33
<i>Quadro 6 - Influência do código (campo e do método de produção) nos teores médios de matéria seca, amido e açúcares simples nas datas 2 e 3.....</i>	<i>33</i>
Quadro 7 -Teores médios de de amido, matéria seca e açúcares simples para as datas 2 e 3 nos campos 17, 18 e 19.	34
Quadro 8 – Teores médios de MS, açúcares simples e amido em cada uma das datas de colheita.....	35
<i>Quadro 9 – Teores médios de MS, açúcares simples e amido para os diferentes condicionalismos de produção em Casével.....</i>	<i>36</i>
<i>Quadro 10 – Teores médios de amido, matéria seca e açúcares simples para os campos 19 ao longo das datas de colheita</i>	<i>37</i>
Quadro 11 - Resultados obtidos para os açúcares das amostras do campo 19B analisadas com antrona, ao longo de quatro datas de colheita.	39
Quadro 12 -Resultados obtidos para os açúcares das amostras do campo 19A analisadas com antrona, ao longo de quatro datas de colheita	60
Quadro 13 - Resultados obtidos para os açúcares das amostras do campo 19C analisadas com antrona, ao longo de quatro datas de colheita	60
Quadro 14 - Resultados obtidos para os açúcares das amostras do campo 19D analisadas com antrona, ao longo de quatro datas de colheita	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Semente encontrada em Guilá Naqitz que aparenta ser de <i>C. pepo</i> e que se estima ter 8910 ± 50 ^{14}C anos - cerca de 10000 anos do calendário, (Smith 1997).....	3
Figura 2 - Provável distribuição e centro de origem das 5 espécies cultivadas do género <i>Cucurbita</i> (Fonte: Whitaker e Bemis, 1975)	4
Figura 3 - Produção, em toneladas e área ocupada, em hectares, dos maiores produtores de abóboras, aboborinhas e cabaças de 2014 (FAOSTAT 2017).....	5
Figura 4 - Evolução da produção mundial de abóboras, aboborinhas e cabaças entre 2004 e 2014, em toneladas (FAOSTAT 2017).	5
Figura 5 - Evolução da produção de abóboras, aboborinhas e cabaças em Portugal entre 2004 e 2014 (FAOSTAT 2017).....	6
Figura 6 - Classificação de Hidratos de Carbono (adaptado de Gomes de Castro, 2003). ...	12
Figura 7 - Estrutura de cadeia aberta da glucose, frutose e galactose (Fonte: http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/introducao_carboidratos/introducao_ch.htm , consultado no dia 21/02/2018).	13
Figura 8 - Estrutura da sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) (Fonte: http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/carboidratos.html , consultado a 27/02/2018).....	13
Figura 9 - Estrutura da rafinose ($\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$) (Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Rafinose#/media/File:Raffinose.svg , consultado a 27/02/2018).	14
Figura 10 - Estrutura da estaquiose ($\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{O}_{21}$) (Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Estaquiose#/media/File:Stachyose.svg , consultado a 12/03/2018).	14
Figura 11- Estrutura da verbascose ($\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_{26}$) (Fonte: https://secure.megazyme.com/Verbascose)	15
Figura 12 - Fórmula estrutural da amilose e da amilopectina (Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Amylose2.svg , https://pt.wikipedia.org/wiki/Amilopectina#/media/File:Amylopektin_Sessel.svg , consultados a 27/02/2018).	15
Figura 13 - Síntese de amido a partir da fotossíntese (Streb & Zeeman, 2012).....	16
Figura 14 - Reações de base do teste da antrona com a glucose (Fonte: https://www.slideshare.net/MuhammadFazalurRehma3/carbohydrates-59234998 , consultado a 15/03/2018; Alves da Silva, 2012)	21
Figura 15 - Equação 1 do método escolhido para deteção do amido	22
Figura 16 - Equação 2 do método escolhido para deteção do amido	22
Figura 17 - Equação 3 do método escolhido para deteção do amido	22
Figura 18 - Equação 4 do método escolhido para deteção do amido	22

Figura 19 - Trituração das amostras com a ajuda de azoto líquido num almofariz.....	25
Figura 20 - Amostras a secar na estufa modelo 600 da Memmert.....	25
Figura 21 - Reação colorimétrica obtida após a adição de GOPOD e posterior aquecimento.	27
Figura 22 – Reação colorimétrica obtida para a curva de calibração após reação com a antrona.....	28
Figura 23 - Curva de calibração obtida para a Antrona através de soluções de glucose de concentrações conhecidas.	38
Figura 24 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e refratometria para a evolução do teor de açúcares simples nas amostras do campo 19B ao longo das datas de colheita.	40
Figura 25 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e da digestão com a amilase para a evolução do teor de açúcares complexos nas amostras do campo 19B ao longo das datas de colheita.....	41
<i>Figura 26 - Refratómetro HI96801 Hanna Instruments.</i>	59
Figura 27 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e refratometria para a evolução do teor de açúcares simples nas amostras do campo 19A ao longo das datas de colheita.	62
Figura 28 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e refratometria para a evolução do teor de açúcares simples nas amostras do campo 19C ao longo das datas de colheita.....	62
Figura 29 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e refratometria para a evolução do teor de açúcares simples nas amostras do campo 19D ao longo das datas de colheita.	63
Figura 30 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e da digestão com a amilase para a evolução do teor de açúcares complexos nas amostras do campo 19A ao longo das datas de colheita.....	64
Figura 31 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e da digestão com a amilase para a evolução do teor de açúcares complexos nas amostras do campo 19C ao longo das datas de colheita.....	64
Figura 32 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e da digestão com a amilase para a evolução do teor de açúcares complexos nas amostras do campo 19D ao longo das datas de colheita.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

%: percentagem/por cento

µg: microgramas

µl: microlitros

¹⁴C: datação de Carbono-14

a.C.: antes de Cristo

ANOVA: análise de variância

C.: *Cucurbita*

cm: centímetros

CO₂: Dióxido de Carbono

Dig. Amilase: Método de deteção de amido por digestão com a enzima Amilase

dS/m: deciSiemens por metro

ETOH: álcool etílico

g: grama

GC: Cromatografia gasosa (“Gas Chromatography”)

GOPOD: Glucose oxidase, peroxidase e 4-aminoantipirina

H₂O: água

H₂O₂: Peroxido de hidrogénio

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

HC: Hidratos de Carbono

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta performance)

kg: quilograma

l: litro

LED: Díodo Emissor de Luz

M: molar

mg/dm²: miligramas por decímetro quadrado

mg/l: miligramas por litro

mg: miligramas

min: minutos

ml: mililitros

mm: milímetros

MS: Matéria Seca

nm: nanómetros

O₂: oxigénio

°Brix: graus Brix

°C: graus Celsius

pH: potencial hidrogeniónico

RFO: Oligossacáridos da família da rafinose

R²: Coeficiente de determinação

rpm: rotações por minuto

sol: solução

spp: espécie

UV: Ultra-violeta

1. INTRODUÇÃO

A família das cucurbitáceas sempre representou uma fatia importante das hortícolas consumidas no mundo. Em Portugal, o consumo destas hortícolas tem vindo a crescer bastante ao longo dos últimos anos e como tal, os agricultores portugueses começam a apostar e a investir na sua produção e na introdução de novas variedades. Entre estas novas apostas inclui-se a abóbora manteiga, que começa a ter alguma expressão no mercado nacional e que é largamente exportada para outros países europeus.

Para a produção agrícola em geral é sempre importante determinar as melhores datas de colheita e perceber qual o método de produção mais eficiente para que se obtenha o máximo rendimento de uma cultura. Numa cultura relativamente recente, é ainda mais importante que se façam estudos que suportem e apoiem novas e mais apostas nessas mesmas culturas. Como tal, num contexto de apoio à produção, é importante conhecer formas, se possível expeditas, de avaliar parâmetros de interesse que ajudem na tomada de decisão do plano de cultura.

Esta dissertação surgiu de parceria entre uma empresa distribuidora de hortícolas para indústria e o Instituto Superior de Agronomia. Inicialmente o objetivo era, trabalhando em conjunto com essa empresa, acompanhar o desenvolvimentos de abóboras manteiga no campo e, consoante aplicação de determinados fatores de produção e a sua localização, determinar o teor de açúcares simples (de baixo peso molecular), amido e matéria seca nos frutos, ao longo de várias datas de colheita em abóboras de diferentes proveniências (Casével, S. Manços e Couço) e com os diferentes fatores de produção, de modo a poder estudar qual a data de colheita ideal para se obter uma abóbora com teores de amido (mais relacionado com a textura) e de açúcares simples (responsáveis pelo sabor mais doce) adequados ao subsequente destino destes frutos em concreto: a incorporação em refeições pré-preparadas para bebés e crianças pequenas. Esta parceria acabou por não se concretizar e conseqüentemente tornou-se difícil a concretização do objetivo visado com o rigor planeado inicialmente. Assim, foi criado um novo objetivo para esta dissertação: procurar um método expedito, num contexto de apoio à produção, que pudesse proporcionar estes resultados de uma forma simples e rápida.

Após a determinação da matéria seca nas diferentes amostras, o doseamento dos hidratos de carbono foi feito com base em três métodos para quantificar os diferentes grupos de hidratos de carbono, de modo a que se pudesse efetuar uma comparação entre eles e apurar a sua praticidade, rapidez e exequibilidade num contexto de apoio à produção agrícola. Analisaram-se então todas as amostras recolhidas por refratometria, para obter o teor de açúcares de baixo peso molecular, e posteriormente por digestão com a enzima

amilase, para se obter o teor de amido. Mais tarde, para equacionar a utilização de um procedimento globalmente mais expedito que o procedimento acima referido, analisaram-se apenas as amostras referentes aos campos de Casével recorrendo ao método da antrona.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais da abóbora

2.1.1. Enquadramento taxonómico

A abóbora pertence à classe *Magnoliopsida*, à ordem *Cucurbitales* e à família *Cucurbitaceae*. A família das cucurbitáceas é relativamente grande e contém cerca de 118 géneros e 825 espécies diferentes (Jeffrey, 1990, cit in Bisognin, 2002). Do género *Cucurbita* fazem parte 5 espécies domesticadas (*C. moschata*, *C. pepo*, *C. mixta*, *C. maxima*, *C. ficifolia*), e cerca de 22 selvagens (Whitaker 1974, cit in Decker 1988; Whitaker & Bemis, 1964).

2.1.2. Origem e expansão

Os vestígios mais ancestrais de cucurbitáceas foram recuperados de uma caverna em Oxaca, no México, e foram identificados como sendo da espécie domesticada *C. pepo*. Neste local foi encontrada uma semente, apresentada na figura 1, que se estima ter cerca de 9800 anos (Smith, 1997). Segundo Almeida (2006), esta espécie era fundamental na alimentação dos Maias e



terá sido a primeira espécie do género *Cucurbita* a chegar à Europa. Neste continente terá experimentado uma diversificação e o mesmo terá acontecido na Ásia menor (Harlan 1951, Vavilov 1949-1950; cit in Decker, 1988).

Figura 1- Semente encontrada em Guilá Naquitz que aparenta ser de *C. pepo* e que se estima ter 8910 ± 50 ^{14}C anos - cerca de 10000 anos do calendário, (Smith 1997)

Os primeiros registos de cucurbitáceas na Europa remontam a cerca de 50 anos após a chegada de Cristóvão Colombo ao continente americano (1492), altura em que começaram a surgir descrições e ilustrações deste género botânico.

A figura 2 mostra a provável distribuição e expansão das 5 espécies domesticadas do género *Cucurbita* e a localização do que se assume ser o centro de origem.

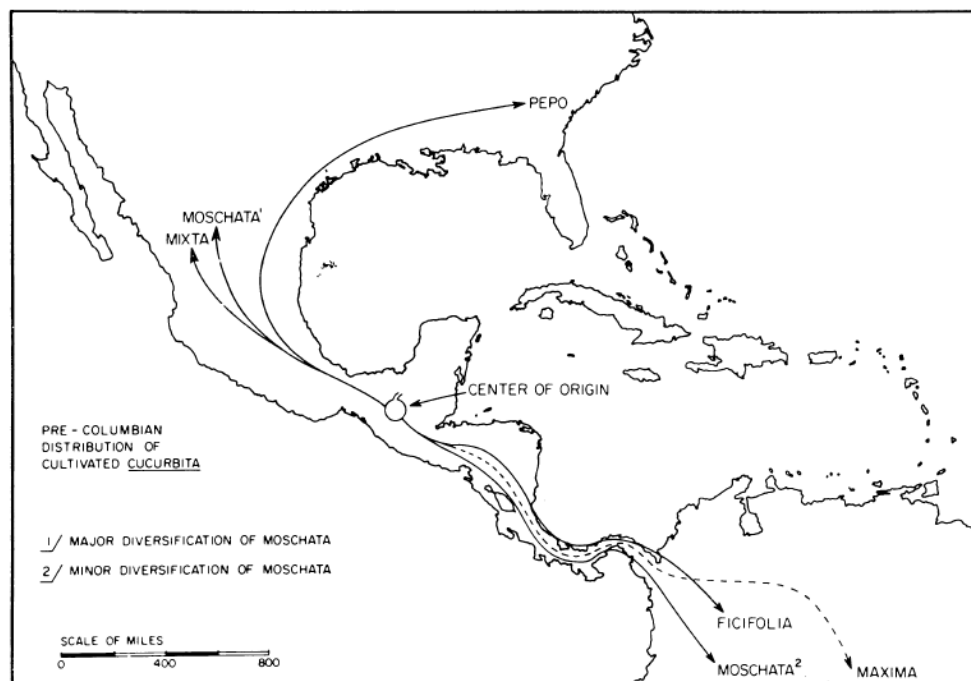


Figura 2 - Provável distribuição e centro de origem das 5 espécies cultivadas do género *Cucurbita* (Fonte: Whitaker e Bemis, 1975)

A espécie *C. moschata* é nativa das planícies da América tropical e subtropical (Kumar *et al.*, 2016). Esta espécie espalhou-se por duas áreas nativas distintas, uma no México, de maior importância e outra mais pequena no Norte da América do Sul (Whitaker e Bemis, 1975, *cit in* Bisognin, 2002). É provável que se tenha originado no México e América Central e já era largamente cultivada no sudoeste dos EUA e na América Central e do Sul aquando da Chegada de Cristóvão Colombo ao continente americano (Almeida, 2006; Piperno, 2011). Arqueologistas encontraram vestígios de *C. moschata* no Perú datados de 4000 a 3000 anos a.C. e no México 1440-400 anos a.C., o que sugere uma longa história de domesticação e cultivo desta espécie (Kumar *et al.*, 2016).

2.1.3. Cultura da abóbora no mundo e em Portugal

A abóbora é cultivada em áreas quentes e tem como destino principal a alimentação humana e animal (Kumar *et al.*, 2016). No entanto, as espécies de *Cucurbita* e os seus híbridos também podem ser utilizados como porta-enxerto para a cultura de outras cucurbitáceas, tais como o melão, o pepino e a melancia (Almeida, 2006). Como se pode ver na Figura 3, é uma cultura que tem vindo a expandir-se e a ganhar uma importância cada vez maior. A sua popularidade deve-se à versatilidade na alimentação, pois pode ser consumida em fresco ou processada, e ao seu grande valor nutricional. (Espitia *et al.*, 2005; *cit in* Gamboa *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2016).

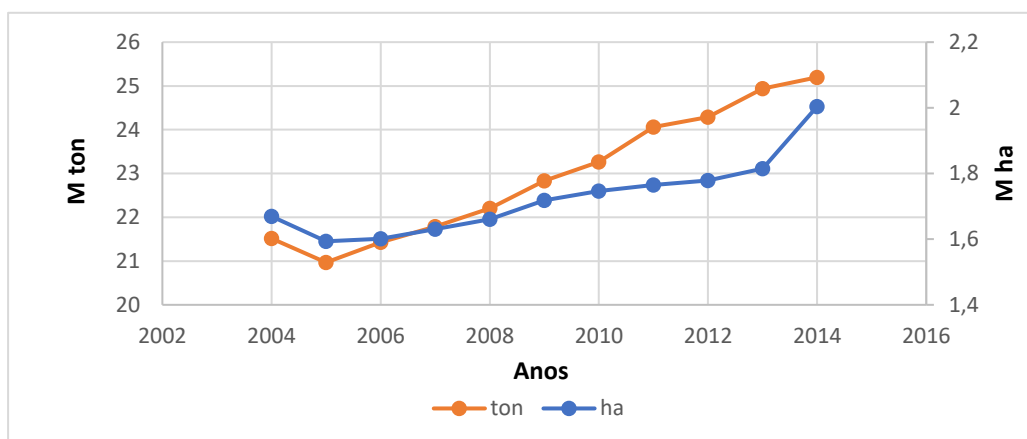


Figura 3 - Produção, em toneladas e área ocupada, em hectares, dos maiores produtores de abóboras, aboborinhas e cabaças de 2014 (FAOSTAT 2017).

A espécie *C. moschata* é uma das que possui os frutos com o maior teor de sólidos solúveis, sabor mais marcado e com a cor da polpa mais intensa e, por isso, é das mais utilizadas na indústria de conservas apertizadas (Almeida, 2006). Para além disto, esta espécie tem várias aplicações na medicina tradicional praticada na América do Sul e Central (Govindani *et al.*, 2012, *cit in* Kumar *et al.*, 2016) sendo usada também para a produção de fibras (Bisognin, 2002).

Atualmente esta cultura é produzida nos cinco continentes, sendo o continente asiático onde se concentra a maior produção. É neste continente que se encontram os maiores produtores mundiais, a China e a Índia, como mostra a Figura 4.

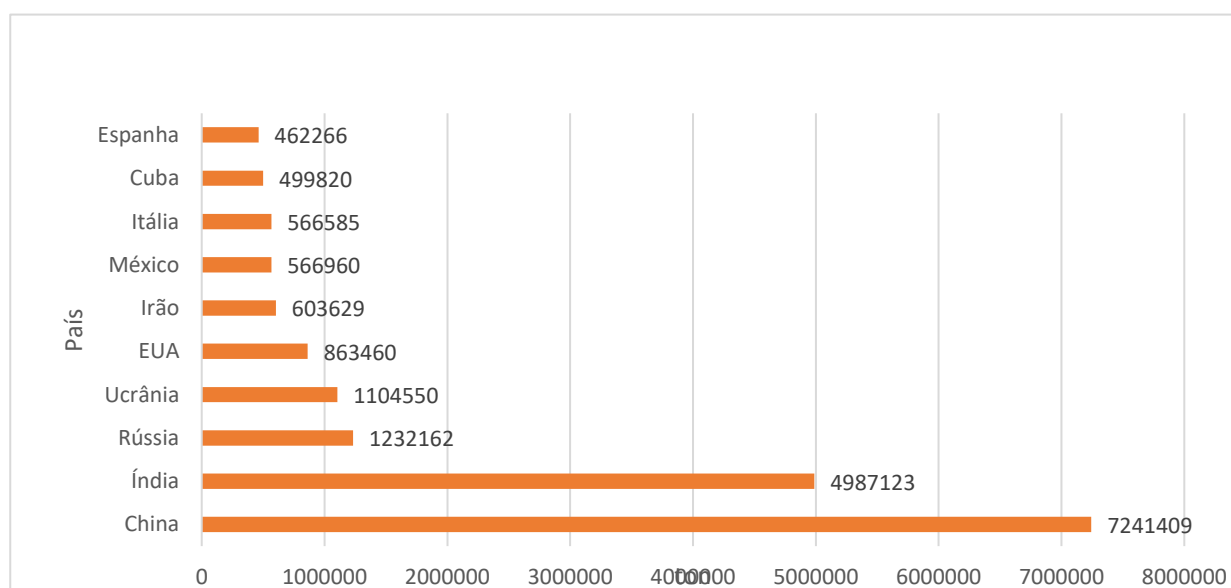


Figura 4 - Evolução da produção mundial de abóboras, aboborinhas e cabaças entre 2004 e 2014, em toneladas (FAOSTAT 2017).

A cultura da abóbora em Portugal era considerada uma cultura secundária, essencialmente destinada à alimentação animal, mas, nas últimas décadas, tem vindo a ganhar mais expressão (ver Figura 5). Atualmente a produção portuguesa tem como principal destino a exportação para países grandes consumidores de abóbora tipo “*butternut*”, que não têm produção suficiente, tais como Inglaterra, França e Alemanha. A exportação representa cerca de 60 a 70% da produção desta abóbora. Em Portugal, é consumida essencialmente em sopas e doces e a produção está concentrada maioritariamente no Oeste, que detém cerca de 74% de toda a produção nacional. Nesta região encontram-se clima e solos propícios (ver 2.1.5) para a produção desta cultura. O concelho com maior expressão é o da Lourinhã, que é o maior produtor em toda a região Oeste.

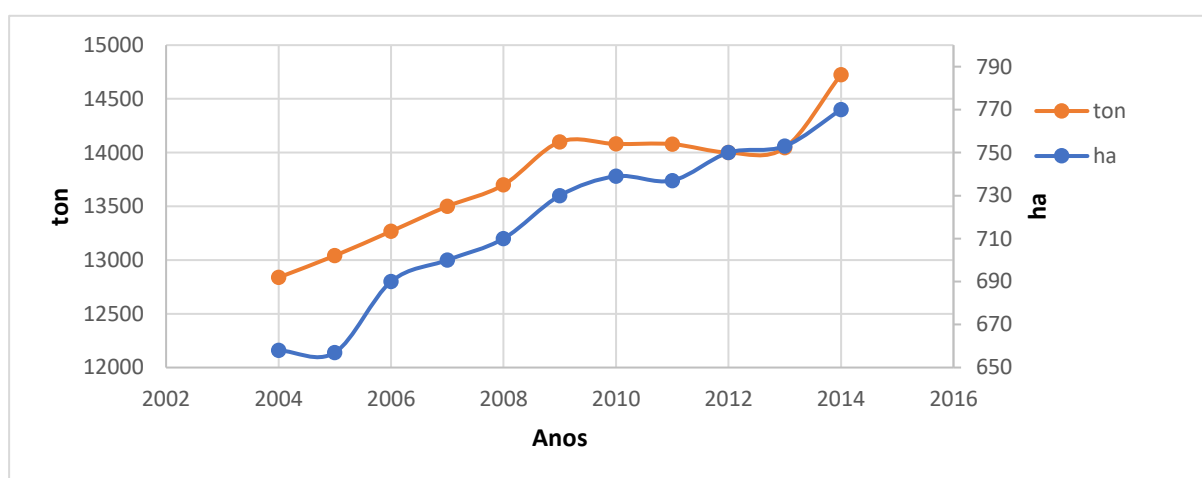


Figura 5 - Evolução da produção de abóboras, aboborinhas e cabaças em Portugal entre 2004 e 2014 (FAOSTAT 2017).

2.1.4. Morfologia

A *C. moschata* é uma planta herbácea e anual.

O sistema radicular desta planta tem maior extensão lateral do que em profundidade e, embora a maioria das raízes se estenda até aos 30 cm de profundidade do solo, a raiz pivotante pode atingir 1 m de profundidade (Souza *et al.*, 1995).

O caule é herbáceo ou semi-lenhoso ramificado, e emite, a partir do eixo principal, diversas ramas laterais ou primárias, que por sua vez emitem ramificações secundárias. O ramo principal e os ramos secundários podem atingir até 15 m de comprimento. Os ramos possuem gavinhas, que têm uma função principalmente de suporte e sustentação da planta quando se aproximam de objetos (Putz & Holbrook, 1991, *cit in* Abbey, 2016). Estas gavinhas também têm a função de ajudar a expandir a folhagem e as partes florais da planta, o que permite um maior espaçamento entre folhas e flores, aumentando a penetração da luz na canópis e a eficiência do uso da radiação. Também ajuda na circulação do ar e humidade entre a vegetação e expõe as flores aos agentes polinizadores (Abbey, 2016).

As folhas desta planta são grandes, simples, de pecíolo comprido bem desenvolvido e estão dispostas alternadamente. Têm formato cordiforme ou reniforme e têm uma coloração verde-escura com áreas prateadas (Souza *et al.*, 1995).

A flor feminina e a flor masculina são bastante distintas, sendo possível diferenciá-las ainda antes da sua abertura. A flor feminina apresenta um ovário ínfero, tri e penta-locular, com formato semelhante ao fruto, e o seu pedúnculo é mais curto que o da flor masculina. A flor masculina apresenta cinco estames concrescentes e um pedúnculo mais comprido. Tanto as flores masculinas como as femininas têm uma coloração amarelada e têm simetria radial (actinomorfas), apresentam cálice e corola distintos (são heteroclamídeas), e são formadas por 5 elementos (pentâmeras).

Os frutos do género *Cucurbita* são dos maiores que se podem encontrar em plantas (Almeida, 2006) e são a parte da planta de maior interesse das cucurbitáceas cultivadas. Os frutos desta espécie em questão são relativamente pequenos, são simples e são caracterizados como um pepónio piriforme. Estes frutos contêm muita polpa e relativamente poucas sementes. As sementes têm uma cor esbranquiçada, são achatadas e têm o formato oval. Nas abóboras manteiga, os frutos podem atingir até 10 cm de diâmetro, têm cerca de 20-25 cm de comprimento e o peso médio ronda 1 kg. A casca é espessa e de cor esbranquiçada. A polpa desta espécie tem coloração amarela alaranjada (Kumar *et al.*, 2016).

2.1.5. Condições edafo-climáticas ideais para o desenvolvimento da cultura

A abóbora é uma cultura essencialmente cultivada em regiões subtropicais e tropicais, uma vez que necessita de bastante calor e humidade para o seu desenvolvimento (Kumar *et al.*, 2016); no entanto, também está adaptada ao clima mediterrânico. É uma planta megatérmica, que necessita de temperaturas elevadas para o seu desenvolvimento, podendo ser cultivada entre 14 e 35°C, como podemos ver no Quadro 2 (Almeida, 2006).

Quadro 1 - Temperaturas cardinais para as Cucurbita spp (adaptado de Almeida, 2006).

Temperatura	Germinação	Vegetação	Ântese e deiscência das anteras
Mínima (°C)	5-10	10	10
Ótima (°C)	30-35	20-25	-
Máxima (°C)	38	32	-

As abóboras preferem solos bem drenados, ricos em matéria orgânica. Os solos arenosos ou franco-arenosos são os mais favoráveis para a produção precoce e os solos argilosos são os mais adequados à cultura de sequeiro ou em condições de irrigação deficiente, mas podem ser suscetíveis de compactação e má drenagem se indevidamente trabalhados. As melhores produtividades obtêm-se em solos com elevada capacidade de retenção de água.

O nível crítico de salinidade está entre os 3,2-4,7 dS/m (Al- Janabi, 2016) e o pH do solo deve estar entre os 5,6 e os 6,8. A abóbora tem moderada tolerância à acidez (Almeida, 2006) e, como todas as cucurbitáceas, não tolera o encharcamento. São sensíveis a geadas.

A abóbora é uma planta indiferente em relação ao fotoperíodo (Sonnenberg 1981), ou seja, floresce independentemente do comprimento do dia.

A necessidade hídrica desta cultura ronda os 500 mm. A rega gota-a-gota é particularmente vantajosa nesta cultura por aumentar a eficiência de uso da água e evitar o humedecimento das folhas (Almeida, 2006).

O tipo e a quantidade de nutrientes necessários dependem das características e do tipo de solo e da quantidade de nutrientes já disponível. As cucurbitáceas requerem baixo teor de azoto e alto teor de fósforo e potássio para um bom desenvolvimento dos frutos. Para aumentar o número de flores, melhorar a produção de pólen e a frutificação é necessária uma fertilização adequada de molibdénio e azoto. A excessiva ou tardia aplicação de azoto promove o crescimento excessivo da vegetação e reduz a produtividade de frutos e a sua

qualidade. Já uma deficiência de azoto pode causar diminuição do tamanho dos frutos e, consequentemente, da produtividade (Sargent e Maynard, 2012). O potássio, o fosforo e o boro afetam o preenchimento, o tamanho, a produção e transporte de açúcar a nível celular e a cor do fruto (Abbey, 2016; Singh e Bharati, 2016). A concentração de cálcio pode ser um fator limitante na qualidade pós-colheita, uma vez que tem grande importância na integridade das estruturas e funções celulares (Sargent e Maynard, 2012).

2.2. Etapas fisiológicas de crescimento e desenvolvimento

2.2.1. Polinização, fertilização e frutificação

A abertura das flores e a ântese requerem temperaturas ótimas e humidade relativa específica. As flores só abrem com temperaturas superiores a 10°C e a temperatura ótima para a ântese e libertação do pólen é entre os 13 e os 18°C (Abbey, 2016).

A ântese tem curta duração (Winsor *et al.*, 2000), as flores abrem durante cerca de 6 horas, no período matinal, não abrindo mais. As flores masculinas abrem e fecham meia hora mais cedo que as femininas (Nepi & Pacini, 1993).

A abertura floral é seguida pela polinização. Neste processo o pólen das anteras do órgão masculino é transferido para o estigma do órgão feminino (Abbey, 2016). Para garantir uma boa frutificação e desenvolvimento dos frutos é necessária uma boa cobertura do estigma pelo pólen (Dumas *et al.*, 1978, *cit in* Abbey, 2016). Nas cucurbitáceas, a receptividade do estigma pode durar cerca 4 dias de forma a coincidir com a ântese (Nepi & Pacini, 1993), no entanto, vários fatores ambientais podem afetar esta viabilidade (Peng *et al.*, 2004, Westerfield, 2014, *cit in* Abbey, 2016).

Nesta espécie, as flores masculinas e femininas encontram-se na mesma planta e a polinização é cruzada e geralmente entomófila (Nepi & Pacini, 1993). Os principais e mais eficientes agentes polinizadores são as abelhas e os géneros mais comuns são: *Bombus* spp., *Apis* spp., *Peponapis* spp. e *Xenoglossa* spp. (Mussen & Thorp, 2014, *cit in* Abbey, 2016). Apesar de existir menor número de flores femininas, estas são visitadas pelos agentes polinizadores mais vezes, provavelmente porque as flores femininas produzem maior quantidade de néctar e este é mais concentrado (Nepi & Pacini, 1993).

Após a polinização e fecundação, o ovário dá origem ao fruto e os óvulos fecundados formam as sementes (Agbagwa *et al.*, 2007, *cit in* Abbey, 2016). As flores femininas não fecundadas produzem frutos mais pequenos, murchos, disformes e sem sementes (lerner & Dana, 2014, *cit in* Abbey, 2016).

2.2.2. Maturação e colheita

Segundo Sinnot (1945, em Miao & Zhang, 2016), o crescimento dos frutos das cucurbitáceas segue um padrão de crescimento em S. Mais tarde, Irving *et al.* (1997) afirmam que o padrão de crescimento e desenvolvimento está dividido em três fases. A primeira fase corresponde ao crescimento inicial, que se inicia na floração e se prolonga durante 30 dias. O segundo estágio corresponde ao desenvolvimento dos frutos que se processa dos 30 dias até aos 60 dias após a floração. A última fase de crescimento diz respeito à maturação dos frutos, começa nos 60 dias após a floração e pode prolongar-se até aos 100 dias após o seu início (Miao & Zhang, 2016).

A maturação dos frutos pode ser classificada como fisiológica ou comercial. A maturação fisiológica é atingida quando o fruto completa os seus ciclos de crescimento e desenvolvimento naturais, enquanto a maturação comercial é determinada pelo consumidor e pelo mercado. A maturação comercial pode ser em qualquer fase do desenvolvimento e crescimento do fruto. A altura da colheita dos frutos é então definida segundo alguns parâmetros de qualidade: sabor, acidez, textura, firmeza, teor de água e nutrientes, forma e tamanho do fruto. No entanto, uma forma de verificar o estado de maturação fisiológica dos frutos é confirmar que o caule se separa do fruto facilmente. Se a intenção for transportar o fruto para mercados mais distantes, a colheita deve ser efetuada antes deste ponto.

Como a polpa é muito succulenta, os frutos das cucurbitáceas são muito sensíveis a danos durante a colheita, manuseamento e transporte. Cortes, feridas, raspadas e compressão são muito comuns durante estes processos e podem contribuir para a deterioração dos frutos ou servir como portas de entrada para doenças e vírus. Por este motivo, a colheita, quer seja manual ou mecânica, deve ser feita com alguns cuidados acrescidos (Abbey, 2016).

2.2.3. Pós-colheita e senescência

É um grande desafio manter a qualidade em termos de sabor, aroma e ausência de doenças no pós-colheita e ao longo de toda a cadeia de distribuição. Do ponto de vista dos consumidores, o sabor e o aroma são os indicadores mais importantes da qualidade e durabilidade dos frutos (Beaulieu *et al.*, 2004). Estes parâmetros resultam de interações complexas entre açúcares, ácidos e compostos voláteis que são influenciadas pela maturação, pela colheita e pelo armazenamento (Sargent & Maynard, 2012).

A alta perecibilidade dos frutos pode ser atribuída ao alto teor de água dos frutos e às elevadas taxas de respiração pós-colheita. Também está relacionada com as condições de conservação e armazenamento (temperatura e humidade) e com a sensibilidade dos frutos

aos gases externos. Devido a estes fatores, devem ter-se alguns cuidados especiais no pós-colheita e no armazenamento.

Antes do armazenamento deve-se retirar o calor de campo, através de um banho de água fria (*hydrocooling*) ou arrefecimento por ar forçado e prevenir o efeito dos gases de origem externa.

Depois de se remover o calor de campo, segue-se um tratamento pós colheita (frequentemente, exposição solar do fruto durante um determinado período), que tem o objetivo de enrijecer a casca. Este processo cicatriza algumas abrasões superficiais, reduz o teor de água dos frutos, aumenta o teor de sólidos solúveis e ajuda a prevenir a entrada de agentes patogénicos que poderiam causar o apodrecimento dos frutos. A vida de prateleira é assim prolongada e a qualidade do fruto é melhorada. Depois deste processo, os frutos ficam prontos para o armazenamento.

O armazenamento deve ser feito em condições de temperatura e humidade ótimas e em recipientes apropriados para o efeito (Abbey, 2016). As cucurbitáceas são sensíveis ao frio e consequentemente são muito suscetíveis a danos causados pelo frio, por isso as temperaturas de armazenamento devem rondar os 7 e os 10°C e a humidade relativa deve rondar os 85-90%. Uma boa ventilação irá minimizar as taxas de respiração e prevenir aquecimento dos frutos e a formação de etileno, gás que acelera a taxa respiratória e a senescência (Abbey, 2016).

2.3. Hidratos de carbono na abóbora

Os hidratos de carbono constituem cerca de 50 a 80% da matéria seca dos vegetais, sendo uma componente nutricional e funcional muito importante (Maness & Perkins-Veazie, 2003).

2.3.2. Classificação

Os hidratos de carbono são normalmente englobados em dois tipos: os açúcares simples e os hidratos de carbono complexos (Chopra & Panesar, 2010). Podem ser classificados de acordo com a figura 7.

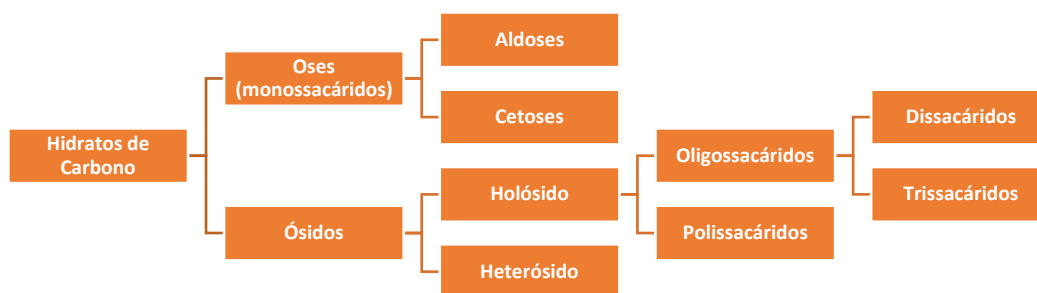


Figura 6 - Classificação de Hidratos de Carbono (adaptado de Gomes de Castro, 2003).

Do ponto de vista químico, os hidratos de carbono são poli-hidroxi-aldeídos ou poli-hidroxi-cetonas e recebem o nome de aldoses ou cetoses, respetivamente, consoante o seu grupo funcional. Incluem também os compostos que por hidrólise se possam transformar nestes (Gomes de Castro, 2003).

As oses são açúcares simples, que não podem ser hidrolisados. Possuem entre 3 e 7 átomos de carbono (Multon, 1992) e recebem o nome de trioses se tiverem três átomos de carbono, com quatro carbonos são chamadas de tetroses e assim sucessivamente (Robyt, 1998). Têm uma função redutora e uma ou mais funções álcool na mesma molécula (Gomes de Castro, 2003).

Os ósidos são açúcares complexos hidrolisáveis (Arnaud, 1978). O seu grupo funcional carbonilo está ligado a um outro composto que pode ser uma ose (holósido) ou uma substância não glucídica (heterósido) (Multon, 1992).

A hidrólise dos holósidos produz uma ou mais oses (Gomes de Castro, 2003). Estes podem ser subdivididos em monossacáridos, dissacáridos, trissacáridos, e polissacáridos, de acordo com o seu grau de polimerização (Sanz & Martínez-Castro, 2009; Morrison & Boyd, 1996). Os polissacáridos resultam então da condensação de um grande número de moléculas de monossacáridos e são substâncias de peso molecular muito elevado (Arnaud, 1978). Os polissacáridos são usados para armazenar glucose como fonte de energia futura e fornecer mecanismos estruturais de células (Chopra & Panesar, 2010). A hidrólise dos heterósidos produz uma ou mais oses e compostos não glucídicos (Gomes de Castro, 2003).

2.3.3. Hidratos de carbono mais relevantes

Os frutos da abóbora contêm açúcar sob a forma de glucose, frutose, sacarose, oligossacáridos da família da rafinose (RFO), galactose e amido (Miao & Zhang, 2016).

A glucose, a frutose e a galactose são monossacáridos de fórmula molecular igual ($C_6H_{12}O_6$), mas estrutura molecular diferente (Figura 8). A glucose é o hidrato de carbono mais comum (Chopra & Panesar, 2010) e a frutose é o hidrato de carbono mais solúvel e o que se oxida com mais facilidade (Gomes de Castro, 2003; Arnaud, 1978). O que diferencia estes dois monossacáridos é o seu grupo funcional, a glucose possui um grupo aldeído e a frutose um grupo cetona.

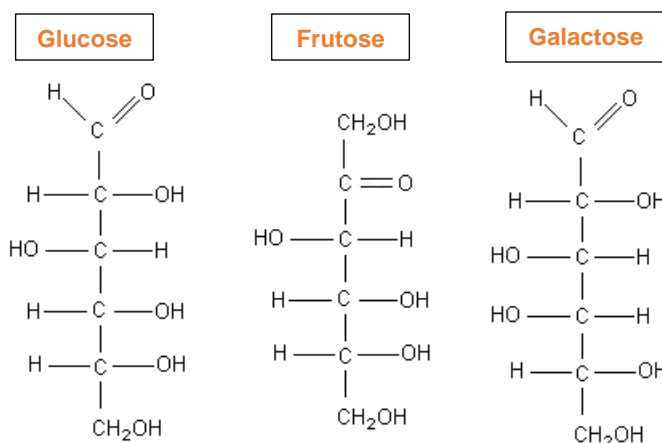


Figura 7 - Estrutura de cadeia aberta da glucose, frutose e galactose
(Fonte: http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/introducao_carboidratos/introducao_ch.htm, consultado no dia 21/02/2018).

A sacarose (Figura 9) é um dissacárido constituído por uma molécula de glucose e uma de frutose, unidas através de uma ligação glicosídica (Arnaud, 1978; Chopra & Panesar, 2010).

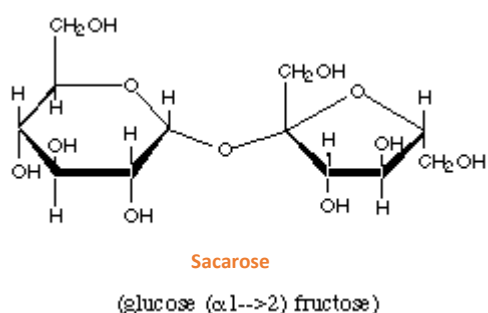


Figura 8 - Estrutura da sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
(Fonte: <http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/carboidratos.html>, consultado a 27/02/2018).

É sintetizada no mesófilo, por ação da enzima sacarose-fosfatase (Lunn & MacRae, 2003), e posteriormente é carregada para o floema, para ser transportado para distâncias maiores (Beebe & Turgeon, 1992).

A inversão da sacarose ou sacarólise consiste na hidrólise de uma molécula de sacarose para produzir glucose e frutose em quantidades iguais (Chopra & Panesar, 2010). Esta hidrólise pode realizar-se em presença de ácidos diluídos (catálise por H^+) ou por catálise biológica, na presença da enzima ácido-invertase (Arnaud, 1978).

A maltose é um dissacárido proveniente da hidrólise do amido que por sua vez se pode hidrolisar em 2 moléculas de glucose (maltose + água = 2 glucose). É o açúcar menos comum na natureza (Chopra & Panesar, 2010).

Os oligossacáridos contêm entre 3 a 10 moléculas de monossacáridos, são açúcares solúveis e conferem um sabor ligeiramente doce, cerca de 30 a 60% da doçura da sacarose.

Esta doçura depende da sua estrutura química e molecular e da presença de outros açúcares na mistura (Crittenden & Playne, 1996). A biossíntese de RFO processa-se através da adição gradual de unidades de galactose à sacarose. Estes oligossacáridos são sintetizados nas folhas e raízes das plantas (Peterbauer *et al.*, 2002). Desta família são essencialmente translocados os oligossacáridos rafinose, estaquiose e verbascose.

Os RFO, para além de serem os açúcares maioritariamente translocados nas cucurbitáceas, potenciam a tolerância aos stresses abióticos a que as estas plantas podem estar sujeitas (Miao & Zhang, 2016). Protegem os frutos da desidratação, atuam como osmoprotetores em condições de stress hídrico e são antioxidantes (El-Sayed *et al.*, 2014, *cit in* Peterbauer *et al.*, 2002).

A rafinose (Figura 10), também chamada melitose, é um trissacárido que consiste na associação de uma molécula de galactose e de uma de sacarose, através de uma ligação glicosídica. No entanto, a hidrólise da rafinose origina

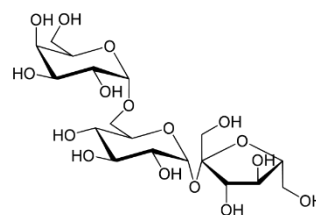


Figura 9 - Estrutura da rafinose (C₁₈H₃₂O₁₆)

(Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Rafinose#/media/File:Raffinose.svg>, consultado a 27/02/2018).

diferentes produtos, dependendo do catalisador que for usado para a reação. A hidrólise em presença de ácidos concentrados leva à formação de uma molécula de glucose, uma de galactose e uma de frutose. Se a hidrólise for feita em presença de ácidos diluídos ou da enzima sacarase forma-se uma molécula de frutose e uma de melobiose, que é um dissacárido. Em presença da enzima maltase, a hidrólise dá origem a uma molécula de frutose e uma de sacarose (Chopra & Panesar, 2010). A rafinose é o trissacárido mais importante das plantas, sendo o holósido mais difundido depois da sacarose (Coimbra & Delgadillo, 1997)

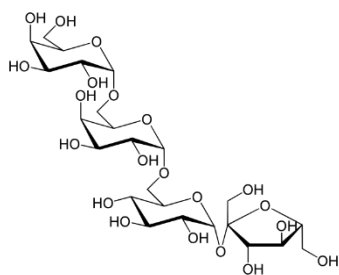


Figura 10 - Estrutura da estaquiose (C₂₄H₄₂O₂₁)

(Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Estaquiose#/media/File:Stachyose.svg>, consultado a 12/03/2018).

A estaquiose (Figura 11) é um tetrassacárido constituído por galactose e rafinose (Koga *et al.*, 1993, *cit in* Fernández *et al.*, 2015). A estaquiose é sintetizada no mesófilo de folhas maduras que exportam hidratos de carbono (Webb & Gorham 1964; Hendrix 1968; Turgeon & Webb 1975; *cit in* Holthaus & Schmitz, 1991) e é o principal açúcar translocado para o transporte para longas distâncias. Como tal, é um dos açúcares predominantes do floema (Zimmermann & Ziegler 1975, *cit in* Beebe & Turgeon, 1992; Holthaus & Schmitz, 1991). É um hidrato de carbono de reserva

importante nas sementes (Handley *et al.* 1983, *cit in* Holthaus & Schmitz, 1991).

A verbascose (Figura 12) é um pentassacárido constituído por uma molécula de sacarose e 3 de galactose. É também usada no transporte, tal como a rafinose e a estaquiose.

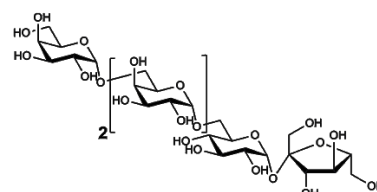


Figura 11- Estrutura da verbascose ($C_{30}H_{52}O_{26}$)
(Fonte: <https://secure.megazyme.com/Verbascose>)

O amido ($C_6H_{10}O_5$)_n é um holósido macromolecular e é formado por duas frações: a amilose e a amilopectina (Figura 12). Tanto a amilose como a amilopectina são constituídas por unidades de glucose unidas entre si por ligações glicosídicas (Gomes de Castro, 2003), sendo a maltose o principal constituinte (Arnaud, 1978). A amilose representa cerca de 20% do total da constituição de amido e tem peso molecular mais baixo e uma forma mais alongada do que a amilopectina. Esta última possui moléculas grandes, mas compactas (Chopra & Panesar, 2010) e é a responsável pela insolubilidade do amido (Zeeman *et al.*, 2010). Como tal, o amido é insolúvel em água fria e em solventes orgânicos, no entanto, quando o colocamos em água, os grânulos começam a absorver a água e aumentam o seu tamanho. À temperatura ambiente, este processo de hidratação é reversível, mas quando é submetido a um aquecimento transforma-se num gel (Gomes de Castro, 2003; Chopra & Panesar, 2010).

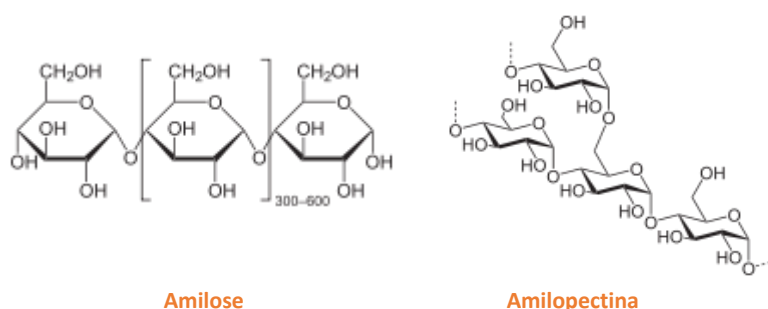


Figura 12 - Fórmula estrutural da amilose e da amilopectina (Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Amylose2.svg>, https://pt.wikipedia.org/wiki/Amilopectina#/media/File:Amylopektin_Sessel.svg, consultados a 27/02/2018).

Nas folhas, a fração de carbono assimilada através da fotossíntese é retida nos cloroplastos como amido em vez de ser convertida em sacarose para ser transportada para zonas de crescimento. Este amido de transição é degradado durante a noite para fornecer substrato para a respiração das folhas e para a síntese continuada de sacarose que será exportada para o resto da planta. Nos órgãos não fotossintéticos (raízes, caules, sementes), a sacarose pode ser convertida em amido para um armazenamento a longo-prazo, nos amiloplastos. Este amido de reserva é mobilizado para sustentar as fases de crescimento da planta ou para suprir necessidades de carbono em processos específicos (Zeeman *et al.*, 2010; Streb & Zeeman, 2012; Pfister & Zeeman, 2016).

A síntese de amido (Figura 14) começa com a produção de ADPglucose, o substrato para a sacarose-sintase. Esta enzima alonga as extremidades não redutoras das cadeias de glucose usando 5'glucose-difosfato (ADPglucose) como dador de glicosil. Depois, as enzimas de ramificação criam ramificações a partir de cadeias pré-existentes através de reações com a glucanotransferase. Por último, as enzimas de desmantelamento hidrolisam algumas das ramificações novamente (Geigenberger, 2003; Pfister & Zeeman, 2016).

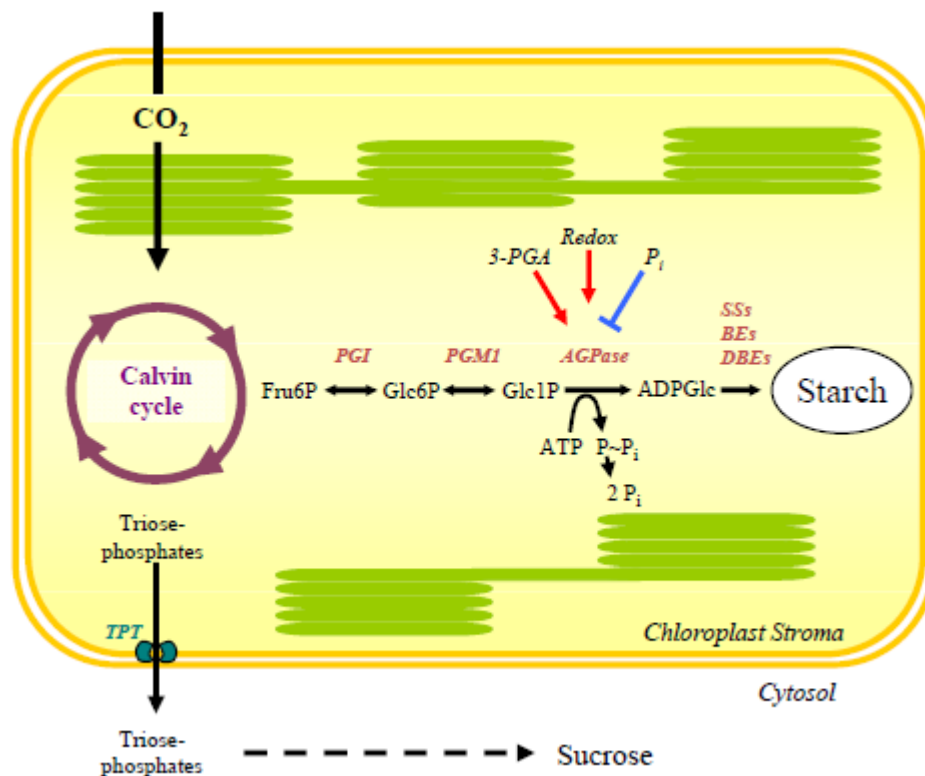


Figura 13 - Síntese de amido a partir da fotossíntese (Streb & Zeeman, 2012)

2.3.4. Metabolismo dos hidratos de carbono

O metabolismo dos hidratos de carbono e a sua regulação têm uma importância fulcral no crescimento e desenvolvimento das plantas (Bruton *et al.*, 1998).

As cucurbitáceas sintetizam e translocam os assimilados maioritariamente sob a forma de oligossacáridos da família da rafinose (RFO), que são açúcares solúveis muito abundantes ao longo de todas as partes da planta (Schaffer *et al.*, 1996; cit in Miao & Zhang, 2016; Bruton *et al.*, 1998). Os oligossacáridos mais comuns são a rafinose, a estaquiose e a verbascose. A vantagem de transportar açúcares nesta forma é que a probabilidade de

perda de soluto é reduzida durante o transporte para distâncias mais longas e, portanto, esse transporte é mais eficiente (Miao & Zhang, 2016).

O crescimento dos frutos das cucurbitáceas é relativamente rápido, devido à rapidez do rácio de transferência de massa no floema (Miao & Zhang, 2016).

2.3.4.1. Metabolismo na germinação das sementes

As cucurbitáceas acumulam lípidos, proteínas, amido e açúcares solúveis nas sementes maduras como fonte de nutrição para a germinação. Os lípidos são o componente que ocupa maior percentagem da constituição das sementes e o menos abundante é o amido (Miao e Zhang, 2016). As sementes contêm também glucose, sacarose, rafinose, estaquiose e verbascose (Handley *et al.* 1983, Botha & Small 1985, El-Adawy & Taha 2001, *cit in* Miao & Zhang, 2016). A estaquiose e a rafionose são rapidamente consumidos na germinação e, a par deste consumo, há um aumento da concentração de sacarose, que é produto da sua degradação enzimática (Handley *et al.* 1983, *cit in* Miao & Zhang, 2016). Os lípidos começam também a diminuir após algumas horas (Pharr & Motomura, 1989, *cit in* Miao & Zhang, 2016), o que demonstra a importância dos açúcares solúveis como fonte de energia nos primeiros estágios da germinação.

Estima-se que os RFO sejam re-sintetizados ao mesmo tempo que há catabolismo de lípidos. A galactinol-sintase é a enzima chave na via de síntese destes oligossacáridos e quando há um aumento desta enzima há nova síntese de RFO. Estes oligossacáridos são transportados no floema desde os cotilédones (*source*) para as raízes ou plântulas (*sink*) (Schauffer *et al.*, 1996 e Savage *et al.*, 2013, *cit in* Miao & Zhang, 2016).

O amido é importante para a germinação de sementes em meios com pouco oxigénio. Em meios com pouca água, aumentam os níveis de sacarose. O aumento de açúcares solúveis pode atuar como fonte de energia ou agente protetor (Miao & Zhang, 2016).

2.3.4.2. Metabolismo dos hidratos de carbono nas folhas

O crescimento das folhas jovens das cucurbitáceas é mantido através da importação de hidratos de carbono solúveis das folhas mais antigas. A maturação (transição de *source* para *sink*) das folhas das cucurbitáceas desenvolve-se da ponta para a base das folhas (Turgeon & Webb, 1973 e Savage *et al.*, 2013, *cit in* Miao & Zhang, 2016) e envolve mudanças anatómicas complexas e mudanças ao nível dos hidratos de carbono solúveis.

Os espaços intercelulares aumentam com a expansão das folhas, o que potencia a difusão e fixação de CO₂, e a maturação dos feixes vasculares desenvolve-se progressivamente,

dos elementos maiores para os mais pequenos. Após estas mudanças começam a ser exportados açúcares (Turgeon & Webb, 1976; *cit in* Miao & Zhang, 2016).

Durante a expansão das folhas observa-se uma diminuição da concentração de sacarose e rafinose e um aumento da concentração de estaquiose, que é o açúcar solúvel mais abundante nas folhas maduras (Pharr & Sox, 1984, *cit in* Miao & Zhang, 2016).

A sacarose é sintetizada em todos os estágios de desenvolvimento, enquanto a síntese de rafinose e estaquiose começa quando se inicia a exportação de assimilados.

A rafinose nas folhas *sink* resulta da degradação de estaquiose importada (Turgeon & Webb, 1975; *cit in* Miao & Zhang, 2016).

Turgeon (1996) sugere que a exportação de assimilados para o floema é feito por “*trapping*” de polímeros. Segundo este modelo, a sacarose, sintetizada no mesófilo, difunde-se por células de companhia especializadas (células intermediárias), onde é usada para a síntese de rafinose e estaquiose. Estes RFO são demasiado grandes para se difundirem de volta para o mesófilo através da célula intermediária e por isso acumulam-se no floema. Mais tarde difundem-se pelos elementos do tubo crivoso para serem transportados para distâncias mais longas (Rennie & Turgeon, 2009; Warmbrodt, 1986).

2.3.4.3. Metabolismo dos hidratos de carbono nos frutos

Os fotoassimilados das folhas acumulam-se no fruto sob várias formas de hidratos de carbono, o que contribui para a sua qualidade (Tateishi *et al.*, 2004). Normalmente, a taxa do fluxo de massa é rápida em cucurbitáceas, o que leva a um crescimento rápido dos frutos destas plantas. No entanto, alguns fatores como a luz, a temperatura e a concentração de dióxido de carbono podem afetar o transporte de fotoassimilados. Estes fatores podem alterar a quantidade de matéria seca disponível para transporte ou afetam diretamente a velocidade do fluxo do floema (Miao & Zhang, 2016).

Os frutos mais antigos têm prioridade na obtenção de fotoassimilados para que estes amadureçam mais rápido quando há limitação dos mesmos. Quando isto acontece, há competição entre frutos, o que resulta na queda de frutos recém-formados (Ho, 1992; *cit in* Miao & Zhang, 2016).

Durante o período de crescimento rápido, cerca de 3300-3400 mg de assimilados são necessários, todos os dias, para cada um dos frutos (Schapendonk & Challa, 1980; Pharr *et al.*, 1985; *cit in* Miao & Zhang, 2016), enquanto as folhas não conseguem disponibilizar mais de 225 mg/dm² de assimilados ao longo das 11 horas de fotoperíodo (Pharr *et al.*, 1985; *cit in* Miao & Zhang, 2016). Portanto, estima-se que serão necessárias cerca de 9 a 10 folhas

para sintetizar fotoassimilados só para um fruto. Geralmente os fotoassimilados são translocados das folhas mais próximas desse fruto (Hughes *et al.*, 1983; Shishido *et al.*, 1992; *cit in* Miao & Zhang, 2016).

Segundo Tateishi *et al.* (2004), o teor de sacarose aumenta gradualmente com o desenvolvimento do fruto. A glucose e a frutose são os principais açúcares presentes nos frutos na fase inicial do desenvolvimento. Durante a fase inicial de crescimento há acumulação de matéria seca e amido, mas durante o desenvolvimento dos frutos jovens, os níveis de matéria seca e amido mantêm-se inalterados, havendo uma diminuição do teor de sacarose no início, mas há acumulação no último estágio de desenvolvimento. A quantidade de sacarose presente no fruto é regulada pela sua conversão em amido. Durante a maturação, o amido é degradado e a sacarose continua a acumular-se (Miao & Zhang, 2016).

2.4. Métodos de doseamento de hidratos de carbono

2.4.1. Introdução

Para analisar o teor de hidratos de carbono presentes num tecido podem ser utilizados vários processos, consoante o objetivo seja a quantificação dos hidratos de carbono totais ou a quantificação separada de grupos de hidratos de carbono. Quando se pretende a quantificação separada, geralmente faz-se uma extração prévia dos açúcares simples do tecido e posterior determinação do teor de amido e/ou de outros hidratos de carbono de alto peso molecular a partir do resíduo. Este processo é algo moroso e oneroso.

2.4.2. Extração e determinação de açúcares simples

A utilização de uma solução de etanol quente e a utilização de uma solução aquosa de metanol e clorofórmio são os métodos mais eficientes e comumente usados para a remoção de açúcares solúveis de tecidos de plantas (Chow & Landhäusser, 2004).

Os extratos das plantas contêm misturas de diversos açúcares (glucose, frutose, galactose, sacarose, maltose, rafinose e estaquiose). Estes açúcares podem ser determinados separadamente por HPLC (high-performance liquid chromatography) ou GC (gas chromatography), mas estes processos são muito caros, requerem aparelhos caros e cada medição é relativamente demorada, o que para análise rápida de um largo número de amostras, não é adequado e especialmente quando apenas se pretende determinar a quantidade total destes açúcares presente nos tecidos (Zhao *et al.*, 2010). Existem também métodos enzimáticos que requerem enzimas específicas para cada um dos açúcares, tornando este processo longo e também oneroso. Os métodos que medem os açúcares

redutores excluem muitos dos oligossacáridos, como a sacarose. (Ashwell, 1957; Miller, 1959; *cit in* Chow & Landhäusser, 2004).

Métodos como a refratometria ou a determinação via antrona são métodos menos laboriosos que parecem ter interesse num âmbito de aplicação em contexto de produção agroindustrial, apesar de poderem ser menos exatos.

2.4.2.1. Doseamento de açúcares solúveis com recurso a refratometria

A refratometria é um método físico que se baseia na utilização de um aparelho que mede o índice de refração de uma substância que possa ser atravessada pela luz. O índice de refração é uma característica ótica de uma substância e do número de partículas dissolvidas nela. A determinação do °Brix é feita através da medição do índice de refração de uma solução num refratómetro, que pode ser manual ou digital. No caso do digital, que foi o utilizado neste trabalho, a luz de um LED passa através de um prisma em contacto com a amostra. Um sensor de imagem determina o ângulo crítico no qual a luz não é mais refratada através da amostra. O refratómetro aplica automaticamente a compensação de temperatura à medição e converte o ângulo de refração num índice de refração. Este índice de refração é proporcional à concentração, em %, de sólidos solúveis presentes numa determinada solução. A escala Brix é calibrada pelo número de gramas de açúcar contidos em 100 g de solução. Assim, o °Brix corresponde à quantidade de açúcar, em gramas, que se encontra em 100 g de solução (Araujo & Fonseca, 2010; Quigley *et al.*, 2013).

2.4.2.2 Detecção de açúcares com recurso a antrona

Em 1946, Dreywood verificou que o aquecimento de hidratos de carbono com antrona, em soluções ácidas, produzia uma cor verde. Foi inicialmente utilizado como um teste qualitativo e mais tarde começou a ser usado para estimar o teor de uma grande variedade de hidratos de carbono (Yemm & Willis, 1954).

O princípio do teste da antrona é baseado na hidrólise ácida das ligações glicosídicas estabelecidas entre os açúcares. O ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) reage então com os açúcares e origina hidroximetilfurfural ou furfural. Estas substâncias reagem posteriormente com a antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno) e originam um complexo de coloração verde-azulada (Figura 15) (Nascimento Silva *et al.*, 2003; Alves da Silva, 2012; Hamza, 2016).

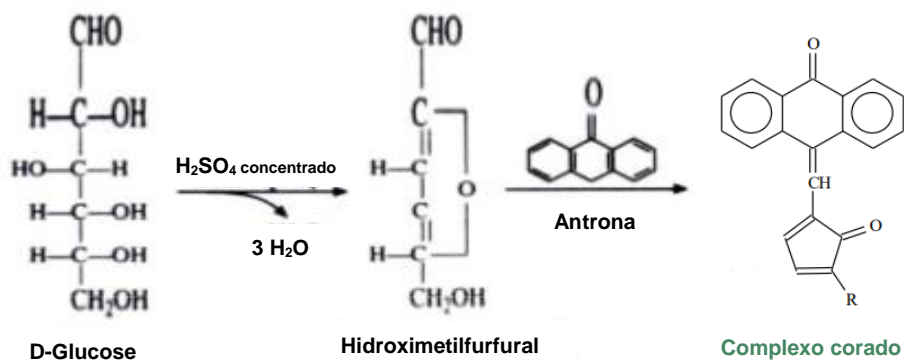


Figura 14 - Reações de base do teste da antrona com a glucose

(Fonte: <https://www.slideshare.net/MuhammadFazalurRehma3/carbohydrates-59234998>, consultado a 15/03/2018; Alves da Silva, 2012)

O método da antrona permite detetar de forma expedita todos os tipos de açúcares (mono e oligossacáridos pequenos), mas, por causa das grandes diferenças nos coeficientes de absorção entre os diferentes tipos de açúcares, pode produzir alguns erros quando se analisam misturas de açúcares (Ashwell 1957, *cit in* Chow & Landhäusser, 2004).

2.4.3. Determinação do teor de amido

Para estimar o teor de amido em amostras de tecido, a maioria dos métodos envolve uma hidrólise do amido em glucose, que é posteriormente quantificada. Entre estes métodos estão as hidrólises com ácido perclórico, que é considerado perigoso por causa da instabilidade deste ácido, a hidrólise com ácido sulfúrico, que é considerado o método mais simples e o mais rápido, e a digestão por enzimas com recurso a alfa-amílase e amiloglucosidase. Este último é considerado o mais preciso, mas ao mesmo tempo o mais trabalhoso (Chow & Landhäusser, 2004).

2.4.3.1 Determinação do teor de amido por hidrólise ácida

Este método propõe a hidrólise do amido com ácido sulfúrico a quente, seguindo-se uma posterior quantificação dos monómeros libertados por métodos de quantificação de monossacáridos (ex. a deteção com antrona) (Chow & Landhäusser, 2004).

2.4.3.2. Determinação do teor de amido com recurso a alfa-amilase e amiloglucosidase

O método para a quantificação amido que se baseia no uso de alfa-amilase termoestável e alfa-glucosidase é um teste específico para medir alfa-glucanos como o amido. É um método simples, quantitativo e seguro para medir o amido total. Este teste permite que a incubação da alfa-amilase e da amiloglucosidade seja feita com o mesmo pH. O amido é completamente solubilizado quando a amostra é incubada a aproximadamente 100°C, na presença de alfa-amilase, conseguindo-se assim medir o amido total presente numa amostra.

Este método baseia-se numa série de reacções enzimáticas. Inicialmente a alfa-amilase hidrolisa o amido em maltodextrinas (Figura 16).

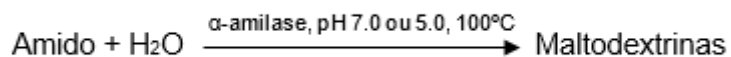


Figura 15 - Equação 1 do método escolhido para deteção do amido

Estas moléculas são posteriormente hidrolisadas em glucose pela amiloglucosidase (Figura 17).

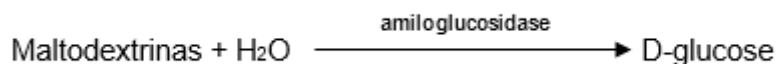


Figura 16 - Equação 2 do método escolhido para deteção do amido

De seguida, a glucose é oxidada para gluconato pela glucose-oxidase e há libertação de uma molécula de peróxido de hidrogénio (Figura 18).

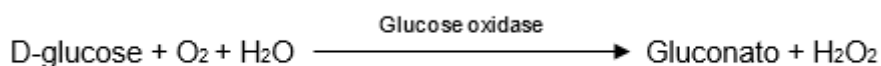


Figura 17 - Equação 3 do método escolhido para deteção do amido

O H_2O_2 é quantitativamente medido numa reacção colorimétrica, em que a peroxidase o transforma numa substância corada (Figura 19).

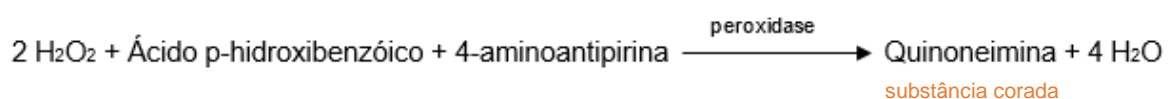


Figura 18 - Equação 4 do método escolhido para deteção do amido

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Introdução

Neste trabalho, procurou-se encontrar métodos expeditos, mas ainda assim rigorosos, para a detecção dos hidratos de carbono num contexto de apoio à produção, evitando métodos muito complexos. Por este motivo, para doseamento dos diferentes hidratos de carbono nas amostras provenientes das diferentes origens, extraíram-se os açúcares simples com recurso a uma solução de etanol e dosearam-se por refratometria. Para detetar o teor de amido, recorreu-se a um método que utiliza alfa-amilase e amiloglucosidase para digestão do amido e subsequente detecção da glucose libertada. Complementarmente, para tentar arranjar um procedimento mais expedito que uniformizasse as duas determinações, tentou-se, com algumas amostras, um método de extração de açúcares simples por etanol e de extração de hidratos de carbono de alto peso molecular por hidrólise ácida, seguidas ambas da detecção pelo método da antrona, para avaliar se seria uma alternativa útil à primeira abordagem referida.

3.2. Reagentes utilizados

Para a detecção de amido pelo método da digestão com amilase adquiriu-se o *kit* da Megazyme® “Total Starch amyloglucosidase/ α -amylase method”, proveniente da Irlanda. A antrona, foi adquirida à empresa Acrós Organics, proveniente da Bélgica.

Os restantes químicos mencionados nesta dissertação são de utilização laboratorial comum e, portanto, já estavam previamente disponíveis no laboratório.

3.3. Equipamentos utilizados

A estufa utilizada para determinação da matéria seca e reação da antrona foi uma estufa Memmert modelo 854 Schwabach. Para secagem a 40°C foi utilizada uma estufa modelo 600 também da Memmert.

O °Brix foi avaliado com recurso a um refratómetro digital portátil modelo HI96801 da Hanna Instruments.

As leituras das densidades óticas foram realizadas em cuvetes de 1 cm de poliestireno comuns num espectrofotómetro Shimadzu modelo UV – Visible Recording Spectrophotometer UV-2100, acoplado a um computador modelo City Desk.

A leitura das absorvâncias das amostras analisadas a partir do método da antrona foi realizada no comprimento de onda de 630 nm e as absorvâncias das amostras para detecção de amido, com recurso ao *kit* da Megazyme®, foram lidas no comprimento de onda de 510 nm.

3.4. Origem e caracterização do material vegetal

Este trabalho foi realizado com base em 87 amostras de frutos de abóbora (*C. moschata*) “*butternut*” recolhidos em cinco datas e a partir de três explorações agrícolas diferentes, correspondentes a condicionalismos de produção diferentes. A localização exata das explorações é desconhecida, pelo que se torna difícil uma caracterização detalhada das mesmas. Sabemos apenas que uma das explorações está situada em São Manços (parcela 17), outra em Couço (parcela 18) e a outra em Casével (parcela 19). Nestes campos fizeram-se variar alguns fatores de produção. Dentro das mesmas parcelas, com as mesmas restantes condições, os sectores A correspondem a maior aplicação de cálcio e os sectores B a menor aplicação deste elemento, os sectores C correspondem a uma situação de stress hídrico e os sectores D à aplicação de uma dotação normal de rega.

3.5. Recolha e preparação das amostras

A recolha dos frutos foi feita de forma aleatória em cada um dos sectores. Recolheram-se 3 frutos por sector e parcela.

A primeira data de colheita foi no dia 23 de agosto de 2016, realizada nos campos de S. Manços (17) e Couço (18), em sectores com mais (A) e menos cálcio (B). A segunda colheita ocorreu no dia 13 de setembro de 2016, recolheram-se amostras dos campos de S. Manços e Couço, em sectores com mais e menos cálcio e dos campos de Casével, em sectores com mais e menos cálcio e em sectores sujeitos a stress hídrico (C) e com dotação normal de rega (D). No dia 29 de setembro de 2016 fez-se nova colheita, foram colhidos frutos das mesmas parcelas da data anterior. Na quarta data, 11 de outubro de 2016, apenas foram colhidos frutos das parcelas de Casével (19), uma vez que o calor excessivo que se fez sentir desencadeou o rachamento dos frutos nas outras localizações, sendo apenas possível realizar esta colheita mais tardia nestes terrenos. Esta data correspondeu ao levantamento do campo. Após um mês e meio de armazenamento destes frutos em local seco e fresco, a 23 de novembro de 2016, realizou-se nova toma de frutos da parcela de Casével para posterior análise.

As amostras foram levadas para o Laboratório de Horticultura do Instituto Superior de Agronomia. Os frutos foram cortados, e uma talhada foi seccionada em fatias fininhas. Cerca de 1g de material vegetal fatiado foi colocado a secar em estufa a 100°C para posterior determinação da matéria seca. O restante material fatiado foi congelado (em porções com cerca de 1 g cada) com choque de azoto líquido e armazenado a -80°C até ao processamento analítico. Mais tarde, as amostras foram trituradas em azoto líquido, sem prévia descongelação, com a ajuda de um almofariz (Figura 20). Depois deste processo,

foram imediatamente colocadas num frasco de vidro e seguiram para a estufa modelo 600 da Memmert onde permaneceram cerca de 2 a 3 dias a secar, a cerca de 40°C (Figura 21).



Figura 19 - Trituração das amostras com a ajuda de azoto líquido num almofariz



Figura 20 - Amostras a secar na estufa modelo 600 da Memmert.

3.5. Extração de hidratos de carbono a partir do material seco

3.5.1. Extração de açúcares simples para os métodos da deteção do amido por digestão com amílase e da refratometria

Para a extração de açúcares de baixo peso molecular, fez-se uma extração com álcool etílico. Para cada uma das amostras, retiraram-se 120-130 mg da amostra em pó seca para um tubo de polipropileno de 50 ml e adicionaram-se 5 ml de ETOH 80%. Colocou-se o tubo em banho-maria durante 10 minutos a 85°C com agitações periódicas no vórtex. De seguida utilizou-se a centrífuga Hermle Z383K a 5000 rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente, para separar o sedimento da fração líquida. O sedimento foi utilizado para a quantificação de amido e o sobrenadante foi utilizado para a deteção de açúcares solúveis.

3.5.2 Extração de frações separadas de hidratos de carbono para a deteção pelo método da antrona

Para o método da antrona realizaram-se diferentes extrações. Com o objetivo de extrair todos os hidratos de carbono em conjunto, retiraram-se 120-130 mg da amostra em pó para um tubo de 50 ml, ao qual se adicionaram 2,5 ml de água destilada esterilizada e 2,5 ml de H₂SO₄. De seguida colocou-se o tubo em banho-maria durante 30 min a 65°C, agitando periodicamente, para promover uma hidrólise ácida das moléculas de alto peso molecular. Centrifugou-se o tubo a temperatura ambiente, a 6000 rpm, durante 10 min, de modo a conseguir separar o sobrenadante do resíduo.

Com o objetivo de extrair separadamente os açúcares de baixo peso molecular dos compostos de alto peso molecular, pesaram-se 120-130 mg da amostra em pó e colocou-se num tubo de polipropileno de 50 ml, à qual se juntaram 5 ml de ETOH 80%. De seguida, colocou-se o tubo em banho-maria a 85°C, com agitações periódicas. Ao fim de 30 min retirou-se o tubo e centrifugou-se na centrífuga a 5000 rpm, à temperatura ambiente, durante 10 min. Depois do sedimento separado da fase líquida, retirou-se esta última, que contém açúcares de baixo peso molecular, para um novo tubo. O sedimento remanescente foi sujeito a uma hidrólise ácida como descrito acima, com o objetivo de quantificar então os açúcares com maior peso molecular.

Os sobrenadantes resultantes das extrações foram utilizados na deteção pelo método da antrona.

3.6. Determinação dos açúcares simples por refratometria

Cerca de 150 µl do sobrenadante preparado como descrito no ponto 3.5.1. (sobrenadante resultante da extração em ETOH 80% utilizada para o método de deteção do amido) foram utilizados para medir o °Brix no refratómetro digital. Os valores observados (em °Brix) correspondem a gramas de açúcares (sacarose, glucose e outros monossacáridos) por 100 g de extrato alcoólico. Determinou-se também o °Brix do etanol a 80%.

3.7. Deteção de amido por digestão da amilase

Para quantificar o amido presente no resíduo obtido após a extração referida anteriormente (no ponto 3.5.1.) adicionaram-se 3 ml de α-amilase, preparada previamente. De seguida aqueceu-se em banho-maria durante 12 min a 100°C, agitando de 4 em 4 minutos. Após o término do tempo estipulado, colou-se o tubo num banho-maria a 50°C durante 10 min de modo a estabilizar a temperatura.

Após este tempo, adicionou-se 0,1 ml de amiloglucosidase, agitou-se no vórtex e incubou-se cada amostra em banho-maria a 50°C durante 30 minutos, com agitações periódicas. Preencheu-se o tubo com água destilada até aos 10 ml e centrifugou-se durante 10 min a 5000 rpm à temperatura ambiente. Posteriormente prepararam-se tubos de vidro com 0,1 ml de cada um dos sobrenadantes, mais um tubo de vidro com 0,1 ml de D-glucose (controlo positivo) e mais dois tubos (ensaios em branco) com 0,1 ml de água destilada. Adicionaram-se 3 ml de reagente GOPOD (glucose oxidase, peroxidase e 4-aminoantipirina) a cada um dos tubos, que foram aquecidos em banho-maria a 50°C durante 20 min (Figura 22). Por fim, colocou-se 1 ml de cada uma das amostras em cuvetes de poliestireno e mediram-se, contra o ensaio em branco, no espectrofotómetro.



Figura 21 - Reação colorimétrica obtida após a adição de GOPOD e posterior aquecimento.

A percentagem de amido contida nas amostras foi calculada através da fórmula seguinte:

$$\text{Amido}(\%) = \Delta A \times F \times \frac{FV}{0,1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = A \times \frac{F}{W} \times FV \times 0,9$$

Legenda:

ΔA = Absorvância lida contra o branco

$F = \frac{100 \text{ (}\mu\text{g de D-glucose)}}{\text{absorvância de } 100 \mu\text{g glucose}}$ = Conversão da absorvância para μg

FV = Volume final (10 ml)

0,1 = Volume de amostra analisado

$\frac{1}{1000}$ = Conversão de μg para mg

$\frac{100}{W}$ = Fator para exprimir amido como percentagem de peso

W = peso da amostra (mg)

$\frac{162}{180}$ = Fator de conversão da D-glucose livre para D-glucose anidra (forma que ocorre no amido)

3.8. Deteção com recurso a antrona

O teste da antrona apenas foi aplicado a 48 amostras, correspondentes às abóboras provenientes dos campos de Casével (parcela 19).

Para a construção da curva padrão do teste da antrona, prepararam-se 9 amostras com as seguintes concentrações de glucose: 0; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000; 2000 e 4000 mg/l. Para preparar estas concentrações foram sendo efetuadas várias diluições sucessivas, da maior concentração para a menor. Assim, colocaram-se 40 mg de glucose pura em 10 ml de água destilada para se obter a concentração 4000 mg/l. De seguida retiraram-se 100 μl dessa preparação para um tubo de Eppendorf, à qual se adicionaram 100 μl de água destilada, e assim sucessivamente, até à concentração de glucose mais baixa.

Para efetuar o teste da antrona colocaram-se 20 µl de cada uma das soluções anteriores num tubo de vidro, ao qual se adicionaram 180 µl de água destilada esterilizada e posteriormente 1ml da solução de antrona (200 mg de antrona/100 ml de H₂SO₄ puro). Aquando da preparação destes tubos, prepararam-se mais dois tubos com 200 µl de água destilada (ensaio em branco) mais 1 ml do reagente de antrona. Agitaram-se os tubos e, depois de tapar, colocaram-se numa estufa, a 100°C, durante 10 minutos. Após a incubação na estufa, colocaram-se os tubos num banho de gelo de modo a parar a reação. Por fim passou-se 1 ml de cada solução para as cuvetes de poliestireno (Figura 23) e efetuou-se a leitura das densidades óticas no espectrofotómetro, contra o ensaio em branco a 630 nm. Determinou-se a curva padrão com recurso ao Windows Excel, usando um gráfico de dispersão, sobre o qual se aplicou uma regressão linear. Para averiguar a qualidade do ajuste da curva foi utilizado o coeficiente de determinação (R²).

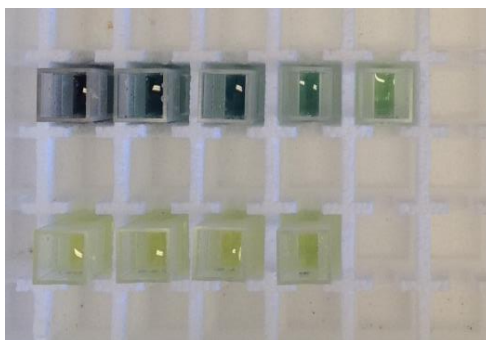


Figura 22 – Reação colorimétrica obtida para a curva de calibração após reação com a antrona.

Após a construção da curva de calibração, as amostras foram sujeitas à reação com o reagente de antrona como apresentado, realizando-se então o processo referido nas amostras extraídas com ETOH 80% e H₂O+H₂SO₄ (processo referido no ponto 3.5.2.).

As absorvâncias obtidas foram convertidas em concentração equivalente de glucose com recurso à curva de calibração.

3.9. Tratamento de dados

Os dados relativos ao doseamento de hidratos de carbono presentes nos frutos recolhidos, a partir de refratometria e do método da amilase, foram tratados estatisticamente através do software R (n=3, nível significância $\alpha=0.05$). Foi utilizado o pacote *Agricolae*® para comparação de médias. Realizaram-se várias análises de variância (ANOVA) de modo a que fosse possível comparar o efeito da data e do “código” (parcela e sector) no teor de amido, de açúcares e matéria seca. Efetuou-se uma análise só para as primeiras três datas, depois só para as datas 2 e 3, depois só para o código 19, acompanhando a evolução dos teores de amido, açúcares solúveis e matéria seca ao longo das várias datas de colheita (2, 3, 4 e 5). Nos casos em que se verificaram diferenças significativas nas análises de

variância ($p \leq 0,05$), utilizou-se o teste de Tukey, para comparação de médias. Estudou-se ainda a existência de efeitos de interação entre as datas e os códigos.

Os resultados obtidos pelo método da antrona apenas foram analisados em termos de tendência, para posterior comparação entre métodos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Doseamento de hidratos de carbono nos frutos de abóbora de diferentes campos e em diferentes datas

No presente capítulo apresentam-se apenas alguns dos resultados obtidos, mais significativos após a análise estatística, das diferenças encontradas entre os vários métodos de produção e campos ao longo das diferentes datas de colheita, com a perspetiva de avaliar a influência dos mesmos na evolução dos teores de matéria seca, de amido e de açúcares simples.

4.1.1. Análise dos resultados obtidos para as datas 1, 2 e 3 e nos campos 17 e 18

Ao fazer uma análise de variância verificamos que há indicação de efeitos significativos (com nível de significância $\alpha=0,05$) das datas de colheita sobre o teor de amido e o teor de açúcares nas abóboras, e não sobre o teor de matéria seca (Quadro 3).

Quadro 2 - Teores médios de matéria seca, amido e açúcares simples nos campos 17 e 18, nas datas 1, 2 e 3.

Data	Teores médios de amido (na MS)	Teores médios de açúcares (na MS)	Teores médios de MS
1	12.28 a	23.37 b	11.35
2	11.23 a	27.16 b	13.80
3	4.89 b	32.74 a	10.86

N=3; letras diferentes em coluna correspondem a médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey, com $\alpha=0.05$

A análise evolutiva ao longo das datas revelou que o teor de amido se mantém nas duas primeiras datas (23 de agosto e 13 de setembro, respetivamente), diminuindo significativamente para a terceira data (29 de setembro), onde se nota uma conversão muito grande do amido em açúcares simples. Devido a esta conversão, os açúcares simples sofreram um aumento no seu teor das primeiras datas, onde não apresentou grande alteração, para a terceira data. O teor de matéria seca apresentou-se relativamente constante ao longo das três datas.

Os resultados revelaram ainda a existência de efeitos significativos do código (método de produção, localização da parcela e tipo de solo) sobre o teor de matéria seca (Quadro 4).

Quadro 3 - Teores médios de matéria seca, amido e açúcares simples nos campos 17 e 18 em função do método de produção e do campo nas datas 1, 2 e 3.

Código	Teores médios de amido (na MS)	Teores médios de açúcares (na MS)	Teores médios de MS
13-017A-16	10.47	30.22	14.84 a
13-017B-16	10.93	26.44	14.82 a
13-018A-16	7.37	29.96	8.87 b
13-018B-16	9.09	24.40	9.50 b

N=3; letras diferentes em coluna correspondem a médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey, com $\alpha=0.05$

Ao observar os resultados obtidos em relação ao código, em que o número 17 representa uma parcela em S. Manços e o número 18 uma parcela no Couço, verificou-se que se obtiveram valores tendencialmente mais promissores na parcela de S. Manços relativamente a todos os teores, mas com uma diferença significativa apenas no teor de matéria seca das abóboras. Isto poderá dever-se ao facto de no campo do Couço existir um imperme, no solo arenoso, que impede a penetração das raízes em profundidade. Obtiveram-se melhores resultados nos campos a que foi aplicado mais cálcio, embora os resultados não tenham manifestado um ganho significativo com essa aplicação.

Apesar de não se terem revelado efeitos significativos da interação sobre nenhum dos teores analisados (Quadro 5), foi possível verificar que os maiores teores de MS foram obtidos na segunda data, para os campos de S. Manços, e os menores para o campo do Couço com mais cálcio aplicado, na primeira data. O maior teor de açúcares simples foi observado numa parcela de S. Manços, na terceira data, e o maior teor de amido foi observado na segunda data, num campo de S. Manços, com uma grande diferença em relação ao menor teor observado (terceira data, campo do Couço).

Quadro 4 – Teores médios de matéria seca, amido e açúcares simples para as datas 1, 2 e 3 nos campos 17 e 18. sujeitos às diferentes modalidades (n=3)

Data	Campo	Amido (na MS)	Açúcares simples (na MS)	MS
1	13-017A-16	13.30	23.57	14.12
1	13-017B-16	12.57	20.75	14.51
1	13-018A-16	10.44	29.23	6.91
1	13-018B-16	12.80	19.91	9.87
2	13-017A-16	12.75	28.69	17.25
2	13-017B-16	16.12	24.15	17.91
2	13-018A-16	8.44	28.47	11.02
2	13-018B-16	7.60	27.32	9.03
3	13-017A-16	5.35	38.40	13.14
3	13-017B-16	4.10	34.42	12.02
3	13-018A-16	3.24	32.17	8.68
3	13-018B-16	6.86	25.98	9.6

N=3; letras diferentes em coluna correspondem a médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey, com $\alpha=0.05$

Globalmente, e embora a variabilidade dos resultados e o reduzido número de frutos/amostra não permitam grandes conclusões, os resultados sugerem um aumento tendencial da matéria seca da primeira para a segunda data de colheita, diminuindo depois. Há uma tendência para a diminuição do teor do amido acompanhada de uma tendência para o aumento do teor de açúcares simples ao longo do tempo.

4.1.2. Análise dos resultados obtidos para as datas 2 e 3 nos campos 17, 18 e 19

Ao fazer uma análise de variância, verifica-se a indicação de efeito significativo (ao nível de significância 0,05) da data sobre o teor de amido e sobre o teor de matéria seca (Quadro 6), do código sobre o teor de amido, de açúcares simples e de matéria seca (Quadro 7) e da interação entre a data e o código sobre o teor de amido (Quadro 8).

Quadro 5 - Influência da data no teor médio de matéria seca, amido e açúcares simples os campos 17, 18 e 19.

Data	Teores médios de amido (na MS)	Teores médios de açúcares (na MS)	Teores médios de MS
2	11.91 a	23.89	15.52 a
3	8.47 b	27.55	13.46 b

N=3; letras diferentes em coluna correspondem a médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey, com $\alpha=0.05$

A análise da evolução dos teores médios ao longo das datas revelou que o teor de amido diminuiu significativamente da segunda para a terceira data de colheita (13 e 29 setembro, respetivamente), embora os teores de açúcares simples não tenham sofrido alteração significativa ao longo das datas (houve uma tendência ligeira de subida, mas não significativa). Os teores de matéria seca acompanham os teores de amido, havendo também uma diminuição. Os frutos encontravam-se provavelmente já numa fase avançada de maturação, estando os processos respiratórios a sobrepor-se a alguns processos de síntese que ainda pudessem ocorrer, sendo assim o balanço negativo. Visto que o teor de açúcares simples não aumentou significativamente, conclui-se que houve perdas da segunda para a terceira colheita e, portanto, todo o campo deveria ter sido colhido na segunda data.

Quadro 6 - Influência do código (campo e do método de produção) nos teores médios de matéria seca, amido e açúcares simples nas datas 2 e 3.

Código	Teores médios de amido	Teores médios de açúcares (na MS)	Teores médios de MS (na MS)
13-017A-16	9.05 bc	33.54 a	15.19 ab
13-017B-16	10.11 abc	29.29 ab	14.97 ab
13-018A-16	5.84 c	30.32 ab	9.85 bc
13-018B-16	7.23 bc	26.65 ab	9.32 c
13-019A-16	12.19 ab	22.74 ab	17.15 ab
13-019B-16	10.74 abc	21.68 ab	15.09 ab
13-019C-16	10.46 abc	18.10 b	19.03 a
13-019D-16	15.91 a	23.47 ab	15.34 ab

N=3; letras diferentes em coluna correspondem a médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey, com $\alpha=0.05$

A análise realizada aos vários códigos revelou que os valores mais elevados de matéria seca e amido foram obtidos nas parcelas de Casével, enquanto o maior teor de açúcares simples foi observado numa parcela de S. Manços. Em geral, os teores mais baixos foram

registados nas parcelas do Couço, exceto nos teores de açúcares simples, cujo valor mais baixo foi observado numa parcela de Casével.

Os valores mais baixos obtidos no Couço poderão explicar-se talvez pela já mencionada presença de um solo arenoso com um imperme, que poderá ter levado a um maior avanço fisiológico da cultura. Este avanço originaria maior teor de açúcares simples e menor teor de matéria seca e de amido.

O campo de Casével encontrava-se provavelmente mais atrasado, pois teve frutos até mais tarde. A sua menor maturação fisiológica explica estes maiores teores de amido e de matéria seca.

A análise de variância revelou efeito significativo da interação entre a data e o código apenas sobre os amidos, concluindo-se que os teores mais elevados foram obtidos na segunda data de colheita, para um campo de S. Manços e para outro de Casével.

Quadro 7 - Teores médios de de amido, matéria seca e açúcares simples para as datas 2 e 3 nos campos 17, 18 e 19.

Data	Campo	Amido (na MS)	Açúcares simples (na MS)	MS
2	13-017A-16	12.75 abcd	28.69	17.25
2	13-017B-16	16.12 a	24.15	17.91
2	13-018A-16	8.44 abcd	28.47	11.02
2	13-018B-16	7.60 abcd	27.32	9.03
2	13-019A-16	11.13 abcd	18.38	17.70
2	13-019B-16	11.31 abcd	19.52	15.90
2	13-019C-16	11.19 abcd	18.56	20.36
2	13-019D-16	16.74 a	26.05	15.00
3	13-017A-16	5.35 bcd	38.39	13.14
3	13-017B-16	4.10 cd	34.42	12.02
3	13-018A-16	3.24 d	32.17	8.68
3	13-018B-16	6.86 abcd	25.98	9.61
3	13-019A-16	13.25 abc	27.10	16.60
3	13-019B-16	10.17 abcd	23.83	14.28
3	13-019C-16	9.73 abcd	17.64	17.69
3	13-019D-16	15.07 ab	20.89	15.68

N=3; letras diferentes em coluna correspondem a médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey, com $\alpha=0.05$

4.1.3. Análise dos resultados estatísticos obtidos para os campos 19

As abóboras deste campo foram plantadas mais tarde, por isso a colheita prolongou-se durante mais tempo do que nos outros campos.

Na análise de variância realizada, verificou-se a existência de efeitos significativos (com nível de significância de 0,05) da data sobre os teores de amido, açúcares simples e matéria seca (Quadro 9). O código apenas teve efeito significativo sobre o teor de amido (Quadro 10), o mesmo acontecendo com a interação entre a data e o código (Quadro 11).

A análise evolutiva ao longo das quatro datas revelou que o teor de amido se mantém nas duas primeiras datas analisadas (13 e 29 de setembro), diminuindo significativamente para a quarta data (11 de outubro) e desta para a quinta data (23 de novembro, já em condições de armazenamento), onde se verificou uma conversão muito grande do amido em açúcares simples. Devido a esta conversão, os açúcares simples foram sofrendo um aumento no seu teor das duas primeiras datas analisadas, onde não apresentou alteração significativa, para a quarta data, e da quarta para a quinta data. O teor de matéria seca foi diminuindo gradualmente ao longo das quatro datas analisadas.

Quadro 8 – Teores médios de MS, açúcares simples e amido em cada uma das datas de colheita

Data	Teores médios de amido (na MS)	Teores médios de açúcares (na MS)	Teores médios de MS
2	12.59 a	20.63 c	17.24 a
3	12.05 a	22.37 c	16.06 ab
4	7.74 b	31.36 b	14.02 bc
5	2.54 c	39.07 a	12.52 c

N=3; letras diferentes em coluna correspondem a médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey, com $\alpha=0.05$

Os resultados da análise de variância dos vários códigos revelaram que apenas o teor de amido foi influenciado significativamente pelo método de produção. Estes resultados revelaram ainda que a quantidade de cálcio aplicado ao solo não teve efeito significativo em nenhum dos teores. Por outro lado, os terrenos irrigados normalmente tiveram maiores teores de amido do que aqueles submetidos a stress hídrico.

Quadro 9 – Teores médios de MS, açúcares simples e amido para os diferentes condicionalismos de produção em Casével.

Código	Teores médios de amido	Teores médios de açúcares (na MS)	Teores médios de MS (na MS)
13-019A-16	9.84 ab	28.74	15.41
13-019B-16	8.06 ab	29.07	14.02
13-019C-16	7.15 b	26.60	15.96
13-019D-16	9.88 a	29.02	14.45

N=3; letras diferentes em coluna correspondem a médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey, com $\alpha=0.05$

A análise da interação entre a data e o código revelou que os melhores teores de amido foram obtidos na segunda e terceira datas de colheita na parcela com dotação normal (19D), enquanto que os resultados mais baixos foram observados na última data de colheita, no campo que foi sujeito a stress hídrico.

Os teores de açúcares simples tendencialmente mais altos foram registados na última data de colheita, nos campos com menor teor de cálcio aplicado e com dotação normal de rega. Poderá especular-se que o menor teor de cálcio contribuiu para um maior avanço da maturação e consequentemente para um maior teor de açúcares simples. Os teores tendencialmente menores foram obtidos na segunda data de colheita, em todos os campos, exceto no que foi regado com dotação normal.

A matéria seca apresentou o teor médio tendencialmente maior na segunda data de colheita quando o campo esteve sujeito a stress hídrico, os teores tendencialmente menores foram obtidos na quinta data de colheita em todos os campos, exceto no que foi regado com dotação normal.

Quadro 10 – Teores médios de amido, matéria seca e açúcares simples para os campos 19 ao longo das datas de colheita

Data	Campo	Amido (na MS)	Açúcares simples (na MS)	MS
2	13-019A-16	11.13 abcd	18.38	17.70
2	13-019B-16	11.31 abcd	19.52	15.90
2	13-019C-16	11.19 abcd	18.56	20.36
2	13-019D-16	16.74 a	26.05	15.00
3	13-019A-16	13.25 ab	27.10	16.60
3	13-019B-16	10.17 abcde	23.83	14.28
3	13-019C-16	9.73 abcdef	17.64	17.69
3	13-019D-16	15.07 a	20.89	15.68
4	13-019A-16	12.71 abc	29.97	15.16
4	13-019B-16	7.51 bcdefg	30.86	14.40
4	13-019C-16	5.54 cdefg	35.42	13.01
4	13-019D-16	5.20 defg	29.20	13.49
5	13-019A-16	2.28 fg	39.50	12.17
5	13-019B-16	3.25 efg	42.05	11.48
5	13-019C-16	2.12 g	34.78	12.80
5	13-019D-16	2.50 fg	39.95	13.64

N=3; letras diferentes em coluna correspondem a médias significativamente diferentes pelo teste de Tukey, com $\alpha=0.05$

4.2. Doseamento de açúcares pelo método da antrona

Com o objetivo de encontrar um método mais expedito para realizar as análises anteriores, utilizou-se um outro método para comparação da evolução de açúcares ao longo das várias datas de colheita e métodos de produção nos campos 19. Recorreu-se então ao método da antrona para quantificar os açúcares simples, complexos e totais.

4.2.1. Curva de calibração para o método da antrona

O cálculo dos teores de hidratos de carbono analisados pelo método da antrona para cada data de colheita e para cada um dos campos foi feito com base numa curva de calibração. O reagente padrão utilizado foi a glucose. Esta curva relaciona as absorvâncias medidas no espectrofotómetro com as concentrações, em mg/l, de padrões conhecidos de glucose (Anexo A), para o método da antrona. Na Figura 24 pode observar-se a reta de regressão obtida que sugeriu um ajustamento linear e para a qual se obteve um coeficiente de determinação bastante elevado ($R^2 = 0,9968$). $R^2=1$ significa que toda a amostra é explicada pelo modelo linear, portanto quanto mais R^2 se aproxima de 1 mais adequado é o modelo.

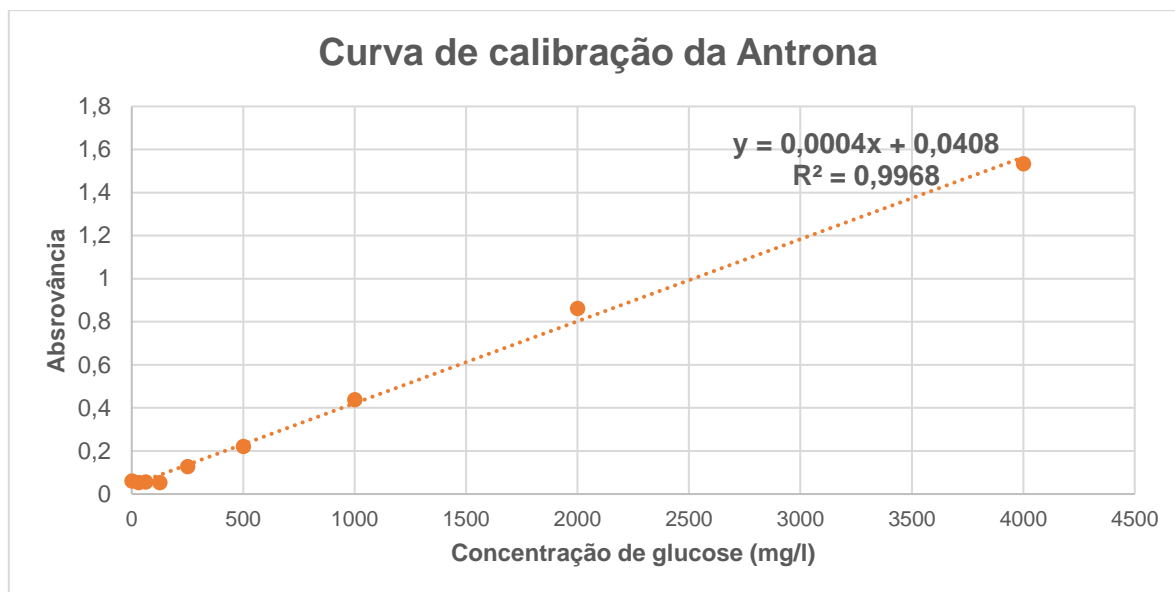


Figura 23 - Curva de calibração obtida para a Antrona através de soluções de glicose de concentrações conhecidas.

4.2.2. Detecção dos hidratos de carbono pelo método da antrona

Para este método foram preparados um extrato alcoólico e dois aquosos. Os extratos aquosos foram realizados durante uma hidrólise ácida em H_2SO_4 . Através do extrato alcoólico foi possível quantificar os açúcares de baixo peso molecular, como a sacarose, glicose e outros monossacáridos. O extrato aquoso realizado subsequentemente ao extrato alcoólico permitiu dosear os açúcares de peso molecular mais elevado (polissacáridos). A partir do extrato aquoso feito sobre o material vegetal inicial pretendia-se determinar o teor de açúcares totais presentes nas amostras. Após a obtenção dos resultados, converteram-se as absorvâncias em concentrações pela curva de calibração. Mediu-se a concentração de ETOH (55,5), da mesma forma que se tinha realizado para as amostras, e subtraiu-se ao valor obtido para os açúcares simples. Esta correção foi efetuada devido à presença de açúcares no etanol que poderiam ser confundidos com os açúcares presentes nas abóboras.

	Simples	Complexos	Totais
	42,61	35,82	46,20
Data 2	31,66	37,61	37,67
	28,59	24,42	35,60
	37,48	27,10	38,35
Data 3	37,47	16,79	37,30
	32,28	26,58	38,01
	38,49	19,56	38,87
Data 4	37,73	24,92	37,33
	37,60	25,22	30,27
	39,86	19,46	40,59
Data 5	38,90	15,69	38,11
	52,16	11,94	53,02

Quadro 11 - Resultados obtidos para os açúcares das amostras do campo 19B analisadas com antrona, ao longo de quatro datas de colheita.

Os resultados obtidos pelo método da antrona (Quadro 12) não foram sujeitos à análise de variância, uma vez que apenas se pretendia comparar os resultados dos dois métodos. Neste capítulo só se apresentam os resultados mais relevantes para esta comparação, os restantes dados obtidos encontram-se no Anexo D.

4.3. Comparação entre métodos

Como já referido anteriormente, pretendia-se encontrar um método mais expedito para fazer o doseamento dos hidratos de carbono presentes nas amostras, que fosse igualmente fidedigno. Como tal, fez-se uma comparação entre o método da antrona e os métodos de refratometria e digestão da amilase. Esta comparação baseou-se apenas nos resultados obtidos para os campos de Casével (19), ao longo de quatro datas de colheita.

A antrona é um método comumente utilizado para a deteção de açúcares. Como os monossacáridos e os oligossacáridos são solúveis em álcool, ao contrário dos hidratos de carbono de alto peso molecular, realizou-se uma primeira extração alcoólica de forma a extrair esses açúcares e analisou-se o extrato obtido por este método. No resíduo permaneceram então os restantes hidratos de carbono, mais complexos. Estes hidratos de carbono foram posteriormente extraídos por hidrólise ácida, uma vez que são insolúveis em

álcool, e por fim foram analisados igualmente aos extratos anteriores pelo método da antrona.

O resultado do método da antrona aplicado a um extrato alcoólico irá ser comparado com o resultado obtido por refratometria. O resultado do teste da antrona aplicado ao extrato aquoso realizado a partir do sedimento remanescente do extrato alcoólico vai ser comparado com o resultado obtido através da análise com o método da detecção de amido por digestão com amilase. A par destas comparações, irá ser feita uma avaliação da eficiência do método da antrona na quantificação dos diferentes hidratos de carbono.

4.3.1. Comparação dos valores de açúcares simples obtidos

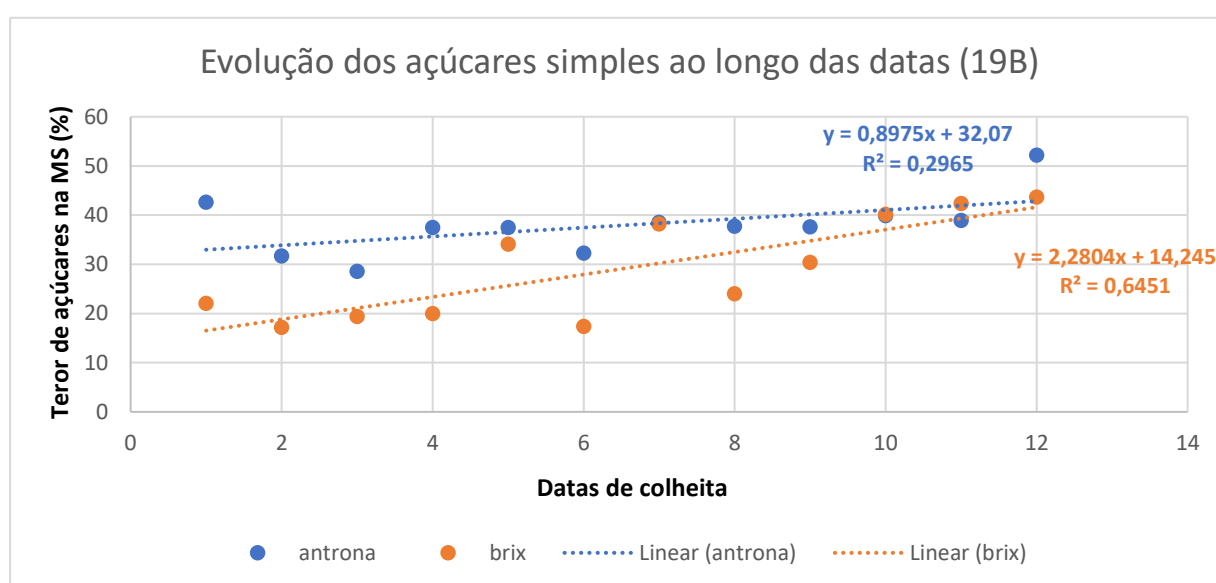


Figura 24 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e refratometria para a evolução do teor de açúcares simples nas amostras do campo 19B ao longo das datas de colheita.

Analisando o gráfico da Figura 24 pode-se concluir que os métodos refletem tendências semelhantes para a análise de açúcares simples. Calculou-se o coeficiente de correlação entre as duas retas e obteve-se o resultado de 0,668 para o campo 19 B. Este resultado indica que existe razoavelmente boa correlação entre os dois métodos.

A linha de tendência do método de refratometria sugere sempre um aumento do teor de açúcares simples ao longo das várias datas de colheita, que era o resultado previsto. No entanto, a quantificação pelo método da antrona nem sempre apresentou esta tendência (Anexo E), embora não se possa excluir que estes resultados possam ter sido originados por erros externos durante a reação.

Assim, embora o método da refratometria tenha apresentado resultados mais coerentes com a evolução natural dos açúcares simples esperada em todos os campos (Anexo E) e seja um método muito mais prático, o método da antrona conseguiu detetar mais açúcares do que a refratometria, e tem melhor resolução (permite identificar diferenças mais finas) sugerindo ser a melhor opção.

4.3.2. Comparação entre os valores de açúcares complexos obtidos

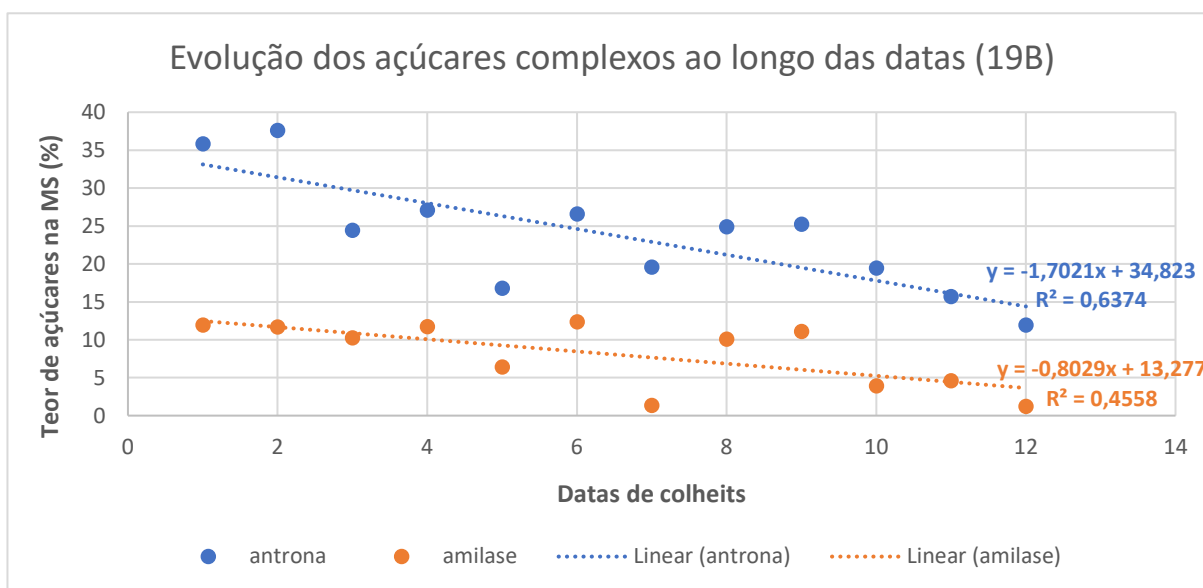


Figura 25 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e da digestão com a amilase para a evolução do teor de açúcares complexos nas amostras do campo 19B ao longo das datas de colheita.

O gráfico da Figura 25, referente ao campo 19B, mostra que a tendência evolutiva é semelhante nos dois casos, sugerindo boa correlação entre os dois métodos para a determinação de açúcares complexos, o que é suportado pelo coeficiente de correlação de 0,817 entre as duas retas de regressão. Os gráficos obtidos para os outros campos (Anexo F) também sugerem boa correlação.

Como era expectável, os açúcares complexos sofrem uma diminuição ao longo das datas de colheita devido à sua degradação em açúcares mais simples. Esta diminuição é suportada pelas retas de regressão dos dois métodos.

No entanto, como o método por digestão da amilase apenas quantifica o teor de amido presente na matéria seca, seria de esperar que os resultados obtidos para o método da antrona fossem mais elevados para cada amostra, uma vez que este método permite medir outros polissacáridos para além do amido, o que não se verificou, sugerindo que será necessário ainda aprofundar melhor as condições de eficiência do teste.

4.3.3. Açúcares totais

Os resultados obtidos para o teor de açúcares totais através do método da antrona não foram os esperados. Os valores de açúcares totais não corresponderam de todo a valores próximos à soma dos açúcares simples com os complexos obtidos através do mesmo método para as mesmas amostras (Anexo D). Provavelmente, a eficiência da extração ficou muito aquém do desejável.

Os resultados obtidos sugerem ainda que os teores de açúcares complexos obtidos anteriormente não são 100% fidedignos uma vez que a hidrólise ácida não parece ter sido totalmente eficiente, logo não há garantia de que os açúcares tenham sido completamente extraídos. Assim, a extração efetuada precedentemente condiciona a disponibilidade dos açúcares para reagir com a antrona e tem implicação nos resultados finais.

O método da antrona não resultou para determinação de açúcares totais neste caso. No entanto, seria a melhor opção caso se conseguisse melhorar a eficiência da hidrólise ácida ou realizar a extração dos açúcares complexos de outra forma. Este método é menos demorado e menos caro que a digestão com amilase alternativa.

Há vários protocolos que preconizam métodos de extração de açúcares complexos mais agressivos (e mais eficazes) mas que não estão alinhados com o objetivo deste trabalho, de estabelecer métodos expeditos e pouco exigentes em equipamento e *know-how* laboratorial, de modo a poderem ser implementados em contexto produtivo.

5. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Esta dissertação focou-se na determinação dos teores de matéria seca, açúcares simples e amido (ambos na matéria seca) em frutos de abóbora manteiga. Baseou-se na análise de amostras que foram colhidas em cinco datas no verão de 2016 (frutos colhidos no campo a 23 de agosto, 13 de setembro, 29 de setembro e 11 de outubro, frutos retirados do armazenamento a 23 de novembro), provenientes de três campos situados em diferentes zonas (S. Manços, Couço e Casével) e sujeitos a métodos de produção distintos. Primeiramente pretendia-se estabelecer a evolução dos referidos teores por forma a poder-se determinar a melhor data de colheita e qual o melhor método de produção por forma a proporcionar o equilíbrio entre teores de amido e de açúcares simples, na matéria seca, desejado para o processamento subsequente (preparação de sopas e purés para bebés e crianças), maximizando tanto quanto possível o teor de matéria seca. Fez-se então uma primeira análise das amostras por refratometria, de forma a quantificar os açúcares de baixo peso molecular. Posteriormente, utilizou-se um método que se baseia na digestão do amido com a enzima amilase, para dosear o teor de amido na matéria seca. Depois de obter essa informação, numa segunda fase do trabalho, analisou-se a possibilidade de utilização de um método mais expedito e menos exigente laboratorialmente, para eventual futura implementação num contexto de apoio à produção, que pudesse obter os resultados equivalentes de uma forma mais simples e rápida. Assim, escolheu-se o método da antrona como candidato, dado ser um processo de doseamento por colorimetria simples de implementar.

Os resultados obtidos revelaram que o teor de matéria seca aumenta até à segunda data (meio de setembro) e começa a diminuir a partir do final de setembro (terceira data de colheita). Esta evolução da matéria seca, que se determina muito facilmente em contexto produtivo, pode ser um indicador importante para o agricultor. À medida que a maturação avança, o balanço entre síntese e consumo é positivo até um certo momento e depois é progressivamente mais negativo para a primeira. Verificou-se que o amido se vai degradando em açúcares simples (os monossacáridos, como a glucose e a frutose, e a sacarose) ao longo das datas de colheita. A diminuição do teor do primeiro reflete-se numa tendência para o aumento dos segundos, não totalmente sobreponível na medida em que, ao longo da maturação, alguns dos açúcares simples podem ser consumidos. A maior acumulação de açúcares simples ocorreu na parcela de S. Manços a que foi aplicada mais cálcio, na terceira data. Em relação ao amido, o mais importante dos hidratos de carbono de maior peso molecular, os teores mais elevados foram registados nas parcelas de Casével. O teor de matéria seca também foi mais elevado nestas parcelas.

A opção pela data de colheita deverá atender à evolução da matéria seca mas também à evolução dos teores de amido e de açúcares simples, em função do destino a dar à produção. A necessidade de maiores teores de amido, ou de maiores teores de açúcares simples, poderá levar a uma gestão diferenciada das épocas de colheita. Para obter os maiores teores de açúcar simples, as colheitas ideais seriam o mais tarde possível (final de setembro/outubro ou final de novembro, no caso de campos com desenvolvimento mais atrasado), embora nem todas as parcelas tenham permitido estas colheitas tardias. Para obter teores de amido mais elevados, as colheitas deverão ser mais precoces.

Neste ensaio, conclui-se que as melhores parcelas para o equilíbrio entre açúcares simples e amido foram as de Casével e S. Manços e que a melhor data de colheita seria em meados de setembro.

Em relação à tentativa de opção por um método alternativo mais expedito, o método da antrona mostrou-se útil para a deteção de açúcares simples, uma vez que não é específico apenas para sacarose, glucose e frutose. Isto é coerente a deteção de valores mais elevados que no caso da refratometria, como se verificou. O método não foi eficiente para deteção de açúcares totais nem dos açúcares complexos presentes nas amostras, talvez devido à (in)eficiência da hidrólise ácida “expedita” que se realizou. Talvez seja necessário utilizar procedimentos mais intensivos de hidrólise (por exemplo a temperaturas mais altas ou durante mais tempo) ou de degradação dos hidratos de carbono de alto peso molecular nos monómeros que vão atuar na reação com a antrona. No entanto, é necessário avaliar se essa adaptação não compromete a vantagem que a deteção via antrona teria em termos de rapidez e exequibilidade. Em condições de funcionamento, este método permite identificar maior quantidade de açúcares complexos que o método de digestão do amido, pois não é específico para este carboidrato. Assim, poderia ser uma boa aproximação para realização em ambiente produtivo, pois é mais fácil de realizar que a digestão via amilase e o amido é o principal hidrato de carbono complexo (a tendência evolutiva dos hidratos de carbono complexos deverá seguir de perto a tendência evolutiva do amido).

Em futuros trabalhos, o método do °Brix para quantificar açúcares simples é sem dúvida mais prático em relação ao método da antrona, embora as concentrações das amostras possam não aconselhar a sua utilização, caso sejam demasiado baixas. Para efeitos comparativos, a refratometria tem também limitações em relação à deteção com antrona, pois não permite detetar diferenças muito pequenas (tem baixa resolução). O método da antrona, ao envolver uma deteção colorimétrica associada a uma curva de calibração tem maior resolução, permitindo detetar diferenças muito mais finas. Tem também a vantagem de permitir detetar oligossacáridos que o refratómetro não consiga quantificar.

Em relação à deteção de açúcares totais e complexos, quando implementado como teste expedito, envolvendo apenas uma hidrólise rápida, o método da antrona não é eficiente para o fazer, visto que não é possível garantir a eficácia dessa mesma hidrólise. Por este motivo, em estudos futuros, seria interessante otimizar o passo prévio de degradação dos hidratos de carbono complexos em monómeros, podendo aplicar-se um teste de iodo para verificar se de facto a hidrólise ácida foi eficiente ou se haveria ainda amido para digerir.

6. BIBLIOGRAFIA

- Abbey, L. (2016). Cucurbits Physiological Stages of Growth. *in* M. Pessarakli, *Hanbook of Cucurbits Growth, Cultural Practices and Physiology*. Boca Raton, Florida: CRC-Press (pp. 151-167).
- Al-Janabi, H. Y. (2016). Effect of Irrigation Water Salinity and Iron Fertilizers on Soil Salinity, Growth and Yield of Cucurbita pepo (L.). *Advances in Life Science and Technology*, 45, 13-21.
- Almeida, D. (2006). Abóboras e Aboborinhas. *Manual de Culturas Hortícolas* Vol. II. Lisboa: Editorial Presença (pp. 179-194).
- Alves da Silva, A. (2012). *Otimização do pré-tratamento ácido de torta de caroço de algodão e bagaço de malte com farinha de pupunha para produção de bioetanol de segunda geração*, 99. Diamantina, Minas Gerais, Brasil: UFVJM.
- Arnaud, P. (1978). Glúcidos. Em P. Arnaud, *Curso de Química Orgânica*. Lisboa: Dinalivro. (pp. 361-378).
- Beaulieu, J., Ingram, D., Lea, J., & Bett-Garber, K. (2004). Effect of Harvest Maturity on the Sensory Characteristics of Fresh-cut Cantaloupe. *Journal of Food Science*, 69(7), S250-S258.
- Beebe, D. U., & Turgeon, R. (1992). Localization of galactinol, raffinose, and stachyose synthesis in Cucurbita pepo leaves. *Planta*, 188, 354-361.
- Bisognin, D. A. (2002). Origin and Evolution of Cultivated Cucurbits. *Ciência Rural*, 32(5), 715-723.
- Bruton, B. D., Russo, V. M., Garcia-Jimenez, J., & Miller, M. E. (1998). Carbohydrate Partitioning, Cultural Practices, and Vine Decline Diseases of Cucurbits *in* J. McCreight, *Cucurbitaceae'98*. Alexandria: ASHS Press (pp. 189-200).
- Chopra, H. K., & Panesar, P. S. (2010). Carbohydrates *in* H. K. Chopra, & P. S. Panesar, *Food Chemistry*. Oxford: Alpha Science (pp. 151-179).
- Chow, P. S., & LandÄusser, S. M. (2004). A method for routine measurements of total sugar and starch content. *Tree Physiology*, 24, 1129-1136.

- Coimbra, M., & Delgadillo, I. (1997). Glúcidos in M. J. Halpern, *Bioquímica*. Lisboa: LIDEL. (pp. 145-211).
- Crittenden, R., & Playne, M. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 353-361.
- Decker, D. S. (1988). Origin(s), Evolution, and Systematics of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany*, 42(1), 4-15.
- Fernández, J., Redondo-Blanco, S., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Clemente, A., & Lombó, F. (2015). Healthy effects of prebiotics and their metabolites against intestinal diseases and colorectal cancer. *AIMS Microbiology*, 1(1), 48-71.
- Gamboa, G. V., Grisales, S. O., & Cabrera, F. (2016). Evaluación morfoagronómica de introducciones centroamericanas de zapallo (*Cucurbita moschata* Duch.). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 8057-8068.
- Geigenberger, P. (2003). Regulation of sucrose to starch conversion in growing potato tubers. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 457-465.
- Gomes de Castro, A. (2003). Hidratos de carbono. Em A. Gomes de Castro, *A química e a reologia no processamento dos alimentos*. Lisboa: Instituto Piaget. (pp. 167-181).
- Holthaus, U., & Schmitz, K. (1991). Distribution and immunolocalization of stachyose synthase in *Cucumis melo* L. *Planta*, 185, 479-486.
- Irving, D. E., Hurst, P. L., & Ragg, J. S. (1997). Changes in Carbohydrates and Carbohydrate Metabolizing Enzymes during the Development, Maturation, and Ripening of Buttercup Squash (*Cucurbita maxima* D. "Delica"). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(3), 310-314.
- Kim, M. Y., Kim, E. J., Kim, Y., Choi, C., & Lee, B. (2012). Comparison of the chemical compositions and nutritive values of various pumpkin. *Nutrition Research and Practice*, 6(1), 21-27.
- Kumar, S., Rattan, P., & Samnotra, R. K. (2016). Squashes and Gourds in M. Pessarakli, *Handbook of Cucurbits Growth, Cultural Practices and Physiology*. Boca Raton, Florida: CRC-Press. (pp. 514-519).
- Lunn, J. E., & MacRaey, E. (2003). New complexities in the synthesis of sucrose. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 208-214.

- Maness, N., & Perkins-Veazie, P. (2003). Soluble and Storage Carbohydrates in J. E. Bartz, *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. New York (US): Marcel Dekker Inc. (p. 361).
- Miao, M., & Zhang, Z. (2016). Carbohydrate Metabolism of Cucurbits. in M. Pessarakli, *Handbook of Cucurbits Growth, Cultural Practices and Physiology*. Boca Raton, Florida: CRC-Press. (pp. 69-85).
- Morrison, R., & Boyd, R. (1996). Parte Terceira - Biomoléculas. Em R. Morrison, & R. Boyd, *Química Orgânica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. (pp. 352-389).
- Multon, J. L. (1992). *Le sucre, les sucres, les édulcorants et les glucides de charge dans les I.A.A.* Paris: Tec & Doc - Lavoisier.
- Nepi, M., & Pacini, E. (1993). Pollination, Pollen Viability and Pistil Receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany*, 72, 527-536.
- Peterbauer, T., Lahuta, L. B., Blochl, A., Mucha, J., Jones, D. A., Hedley, C. L., . . . Richter, A. (2001). Analysis of the Raffinose Family Oligosaccharide Pathway in Pea Seeds with Contrasting Carbohydrate Composition. *Plant Physiology*, 127, 1764-1772.
- Pfister, B., & Zeeman, S. C. (2016). Formation of starch in plant cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 2781–2807.
- Piperno, D. R. (2011). The Origins of Plant Cultivation and Domestication in the New World Tropics. *Current Anthropology*, 52(54), S000.
- Quigley, J. D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P., & Polo, J. (2013). Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 1148–1155.
- Rennie, E. A., & Turgeon, R. (2009). A comprehensive picture of phloem loading strategies. *PNAS*, 106(33), 14162–14167.
- Robyt, J. F. (1998). Beginnings in J. F. Robyt, *Essentials of Carbohydrate Chemistry*. Boston (USA): Springer. (pp. 1-10).
- Sanz, M. L., & Martínez-Castro, I. (2009). Carbohydrates in M. V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo, *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer. (p. 231).
- Sargent, S. A., & Maynard, D. N. (2012). Cucurbits. Em D. Rees, G. Farrell, & J. Orchard, *Crop Post-Harvest: Science and Technology*, Vol. 3: Perishables. UK: John Wiley & Sons. (pp. 286-317).

- Singh, S., & Bharati, L. (2016). Cultivation and Bioprospecting of Perennial Cucurbits. Em M. Pessarakli, *Handbook of Cucurbits Growth, Cultural Practices and Physiology*. Boca Raton: CRC-Press. (pp. 95-108).
- Smith, B. D. (1997). The Initial Domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10,000 Years Ago. *Science*, 276, 932-934.
- Sonnenberg, P. E. (1981). *Olericultura Especial - 2ª Parte*. Goiana, Goiás, Brasil: Universidade Federal de Goiás.
- Souza, J., Peixoto, A. M., & Toledo, F. (1995). *Enciclopédia agrícola brasileira: A-B*. São Paulo: EdUSP.
- Tateishi, A., Kakayama, T., Isobe, K., Nomura, K., Watanabe, K., & Inoue, H. (2004). Changes in sugar Metabolism Enzyme Activities in Cultivars of Two Pumpkin Species (*Cucurbita maxima* and *C. moschata*) during Fruit Development. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73(1), 57-59.
- Turgeon, R. (1996). Phloem loading and plasmodesmata. *Trends in Plant Science Reviews*, 1(12), 418-423.
- Warmbrodt, R. (1986). Structural aspects of the primary tissues with the *Cucurbita pepo* L. root with special reference to the phloem. *New Phytology*, 102, 175-192.
- Whitaker, T. W., & Bemis, W. P. (1964). Evolution in the genus *Cucurbita*. *Evolution*, 18, 553-559.
- Whitaker, T. W., & Bemis, W. P. (1975). Origin and evolution of the cultivated *Cucurbita*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 102(106), 362-368.
- Winsor, J. A., Peretz, S., & Stephenson, A. G. (2000). Pollen competition in a natural population of the *Cucurbita foetidissima* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*, 87(4), 527-532.
- Yemm, E. W., & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, 57(3), 508-514.
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., & Smith, A. M. (2010). Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *The Annual Review of Plant Biology*, 61, 209-234.
- Zhao, D., MacKown, C. T., Starks, P. J., & Kindiger, B. K. (2010). Rapid Analysis of Nonstructural Carbohydrate. *Crop Science*, 50, 1537-1545.

7. WEBGRAFIA

Obtido em 21 de fevereiro de 2018, de

http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/introducao_carboidratos/introducao_ch.htm

Obtido em 27 de fevereiro de 2018, de

<http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/carboidratos.html>

Obtido em 27 de fevereiro de 2018, de

Fonte:<https://pt.wikipedia.org/wiki/Rafinose#/media/File:Raffinose.svg>

Obtido em 12 de março de 2018, de

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Estaquiose#/media/File:Stachyose.svg>

Obtido em 14 de março de 2018, de <https://secure.megazyme.com/Verbascose>

Obtido em 27 de fevereiro de 2018, de <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Amylose2.svg>

Obtido em 27 de fevereiro de 2018, de

https://pt.wikipedia.org/wiki/Amilopectina#/media/File:Amylopektin_Sessel.svg

Obtido em 15 de março de 2018, de

<https://www.slideshare.net/MuhammadFazalurRehma3/carbohydrates-59234998>

(2017). Obtido em julho de 2017, de FAOSTAT:

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

Andreato, H. P., & Travassos, O. P. (s.d.). *Glossário de Botânica*. Obtido em 7 de Julho de 2017, de <http://w3.ufsm.br/herb/glossario.pdf>

Araujo, E., & Fonseca, M. A. (Abril de 2010). *Análise de alimentos BRUX*. Obtido em 16 de Março de 2017, de eBah: <http://www.ebah.pt/content/ABAAAyUcAl/analise-alimentos-brix>

Hamza. (2016). Anthrone Test for Carbohydrates quantitative analysis. Obtido em 16 de Janeiro de 2018, de <https://allmedicalstuff.com/anthrone-test-carbohydrates/>

Silva, R. N., Monteiro, V. N., Alcanfor, J., Assis, E. M., & Asquieri, E. R. (2003). Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Food Science and Technology*, 23(3), 337-341. Obtido de <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000300007>

Streb, S., & Zeeman, S. C. (2012). Starch Metabolism in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* / *American Society of Plant Biologists*, 10, e0160. Obtido de <http://doi.org/10.1199/tab.0160>

ANEXOS

ANEXO A – Protocolo para a quantificação dos HC através do método da Antrona

Método da Antrona

Material

- 2 Gobelés (para preparar a antrona e sol padrão);
- 9 Tubos de Eppendorf de 1,5 ml;
- 144 tubos de vidro para as amostras + 2 para os brancos + 9 para a curva padrão;
- 144 tubos 25 ml polipropileno (3 para cada uma das 48 amostras);
- 146 cuvetes de 1 cm de polipropileno;
- 1 micropipeta de 1000 µl;
- 1 micropipeta de 100 µl;
- 1 micropipeta de 20 µl;
- 1 pipetador automático;
- 3 pipetas de 10 ml;
- Hotte;
- Vórtex ZX³ Velp Científica;
- Balança de precisão Kern PB400-3;
- Centrífuga Hermle Z383K;
- Banho-maria Schutzart DIN 400050 – IP20 2000 W Memmert;
- Banho-maria Schutzart DIN 400050 – IP20 1200 W Memmert;
- Estufa Memmert 854 Schwabach;
- Espectrofotómetro Shimadzu, UV-2100;
- Recipiente com gelo e água.

Reagentes

- Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄);
- Água destilada esterilizada;
- Antrona;
- ETOH 80%;
- Glicose.

Procedimento

Preparação do reagente Antrona

1. Pesar 200 mg de antrona num gobelé;
2. Adicionar 100 ml de H₂SO₄ concentrado;
3. Agitar até se obter uma mistura homogênea.

Preparação das soluções para construção da curva padrão

1. Pesar 40 mg de glucose num gobelé e dissolver em 10 ml de água destilada esterilizada;
2. Agitar até obter uma solução homogênea (Solução Padrão);
3. Fazer diluições sucessivas da solução padrão de glucose (4000 mg/l) com água destilada em tubos de Eppendorf de 1,5 ml, retirando 100 µl da solução anterior e adicionando mais 100 µl de água (Quadro 1);

Quadro 1 - Diluições da solução padrão para a construção da curva padrão.

Concentração de glucose (mg/l)	Solução (µl)	Água (µl)
4000	200 (sol padrão)	0
2000	100 (sol 4000)	100
1000	100 (sol 2000)	100
500	100 (sol 1000)	100
250	100 (sol 500)	100
125	100 (sol 250)	100
62,5	100 (sol 125)	100
31,25	100 (sol 62,5)	100
0	0	200

4. Retirar 200 µl de cada uma das concentrações para um tubo de vidro e adicionar 1 ml de antrona;
5. Fechar os tubos e colocar na estufa a 100°C durante 10 minutos;
6. Colocar os tubos num banho de gelo e água;
7. Preparar as cuvetes e ler no espectrofotômetro contra água destilada (“branco”).

Extração de Açúcares de Baixo Peso Molecular

1. Pesar 120-130 mg da amostra de abóbora e colocar num tubo (A) de 25 ml;
2. Adicionar 5 ml de ETOH 80%;
3. Agitar no vórtex;
4. Colocar em banho-maria a 85°C durante 30 minutos;
5. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos (temperatura ambiente);
6. Retirar o sobrenadante para um outro tubo (C);

Extração de Açúcares de Alto Peso Molecular

1. Ao resíduo deixado no tubo onde se fez a extração em álcool (tubo A), acrescentar 2,5 ml de H_2SO_4 e 2,5 ml de água destilada esterilizada;
2. Colocar em banho-maria a 65°C durante 30 minutos;
3. Centrifugar a 6000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min.

Extração de Açúcares Totais

1. Num tubo (B) colocar cerca de 120-130 mg de amostra de abóbora seca;
2. Adicionar 2,5 ml de água destilada esterilizada e 2,5 ml de H_2SO_4 ;
3. Incubar a 65°C durante 30 minutos;
4. Centrifugar a 6000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min.

Reação com a Antrona

1. Pipetar 20 μl de cada uma das soluções (tubos A, B e C de cada amostra) para tubos de vidro;
2. Adicionar 180 μl de água destilada esterilizada;
3. Adicionar 1 ml de Antrona e agitar;
4. Fechar os tubos e colocar na estufa a 100°C durante 10 minutos;
5. Colocar os tubos num banho de gelo e água;

Preparação e leitura no espectrofotômetro

1. Colocar 1 ml do conteúdo dos tubos de vidro em cuvetes de 1 cm de poliestireno;
2. Abrir o programa UV-2101 PC;
3. Predefinir a leitura para o comprimento de onda de 630 nm;
4. Colocar as duas cuvetes “em branco” e carregar “Auto Zero”, para definir o branco como absorvância zero;
5. Deixar uma das cuvetes em branco e realizar a leitura das amostras contra ela.

ANEXO B – Protocolo para determinação do amido

Método “*Kit Megazyme®*”

Material

- 174 tubos de 25 ml de polipropileno (2 para cada uma das 87 amostras);
- 87 tubos de vidro para as amostras + 1 tubo para o branco + 1 para a glucose;
- 91 cuvetes de 1 cm de polipropileno;
- Gobelés;
- Balança de precisão Kern PB400-3;
- Centrífuga Hermle Z383K;
- Vórtex ZX³ Velp Scientifica;
- 1 pipetador automático;
- 1 pipeta 10 ml;
- 1 pipeta 25 ml;
- 1 micropipeta 100 µl;
- Banho-maria Schutzart DIN 400050 – IP20 2000 W Memmert;
- Espectrofotómetro Shimadzu, UV-2100;
- Placa de aquecimento ARE Heating Magnetic Stirrer Velp Scientifica;
- Hotte.

Reagentes

- ETOH 80%;
- Água destilada;
- α -amilase termoestável (frasco 1 do kit);
- Amiloglucosidase (frasco 2 do kit – sol 2);
- Solução tampão de acetato de sódio 0,1M;
- Solução tampão do reagente GOPOD (frasco 3 do kit);
- Enzimas do reagente GOPOD (frasco 4 do kit);
- Solução padrão de D-glucose em ácido benzóico (frasco 5 do kit – sol 5);
- Amido de milho comum padronizado para controlo (frasco 6 do kit – sol 6).

Procedimento

Preparação da solução de α -amilase (solução 1)

1. Diluir 1 ml do conteúdo do frasco 1 do kit (α -amilase termoestável) em 30 ml de acetato de sódio 0,1M;
2. Manter congelado entre utilizações.

Preparação do GOPOD (solução 4)

1. Diluir o conteúdo do frasco 3 (solução tampão do reagente GOPOD) em 1l de água destilada;
2. Retirar 20 ml da solução anterior e colocar num novo recipiente;
3. Adicionar todo o conteúdo do frasco 4 (enzimas do reagente GOPOD);
4. Verter novamente para o recipiente inicial;
5. Separar a solução final por recipientes mais pequenos e congelar.

Extração em álcool

1. Colocar 120-130 mg da amostra de abóbora num tubo de 25 ml;
2. Adicionar 5 ml de ETOH 80%;
3. Agitar no vórtex;
4. Colocar em banho-maria a 80°C durante 10 minutos, com agitação de 2 em 2 minutos;
5. Centrifugar durante 10 min a 5000 rpm (temperatura ambiente);
6. Retirar o sobrenadante para outro tubo (que segue para a refratometria), que foi pesado previamente.

Determinação do amido

1. Adicionar 3 ml de α -amilase (sol1) ao resíduo resultante da extração em álcool;
2. Agitar no vórtex;
3. Ferver durante 12 minutos a 100°C, na placa de aquecimento dentro de um gobelé com água (ter atenção à rolha por causa da pressão), agitando no vórtex de 4 em 4 min;
4. Estabilizar a temperatura no banho-maria a 50°C durante 10 min;
5. Adicionar 0,1 ml de amiloglucosidase (sol2);
6. Agitar no vórtex;
7. Aquecer em banho-maria a 50°C durante 30 min, agitando de 5 em 5 min;
8. Completar até aos 10 ml com água destilada;
9. Centrifugar durante 10 min a 5000 rpm (temperatura ambiente);
10. Colocar 0,1 ml do sobrenadante em tubos de vidro;
11. Preparar também um tubo com 0,1 ml de D-glucose (sol 5) e outro de controlo com 0,1 ml de água destilada;
12. Adicionar 3 ml de GOPOD (sol 4) a cada um dos tubos;
13. Aquecer em banho-maria a 50°C durante 20 min;

Preparação e leitura no espectrofotômetro

1. Colocar 1 ml do conteúdo dos tubos de vidro em cuvets de 1 cm de poliestireno;
2. Preparar duas cuvets com 1 ml de água destilada (cuvets em branco);
3. Abrir o programa UV-2101 PC;
4. Predefinir a leitura para o comprimento de onda de 510 nm;
5. Colocar as duas cuvets “em branco” e carregar “Auto Zero”, para definir o branco como absorvância zero;
6. Deixar uma das cuvets em branco e realizar a leitura das amostras contra este.

ANEXO C – Protocolo para determinação de açúcares simples

Refratometria

Material

- Refratômetro HI96801 Hanna Instruments;
- Micropipeta de 200 µl;
- Balança de precisão Kern PB400-3;
- Papel absorvente;
- Tubos com o sobrenadante resultante da extração em álcool realizada no método “kit Megazyme®”;
- Água destilada.

Procedimento

1. Pesar os tubos com o sobrenadante;
2. Ligar o refratômetro no botão ON/OFF;
3. Colocar 150 µl de água destilada no prisma do aparelho e clicar no botão “ZERO”;
4. Limpar a água;
5. Colocar 150 µl da solução contida nos tubos e clicar “READ” para ler o °Brix;
6. Limpar o prisma com papel absorvente entre medições.



Figura 26 - Refratômetro HI96801 Hanna Instruments.

ANEXO D – Resultados relativos ao teste da antrona

Quadro 12 - Resultados obtidos para os açúcares das amostras do campo 19A analisadas com antrona, ao longo de quatro datas de colheita

	Simples	Complexos	Totais
Data 2	38,90		33,63
	41,24		32,49
	40,31		8,50
Data 3	38,68		26,49
	39,08		11,74
	33,21		23,61
Data 4	35,25	24,94	34,21
	37,62	19,23	35,36
	32,97	20,57	34,95
Data 5	32,50	14,74	25,80
	34,80	7,62	31,49
	19,09	11,77	12,81

Quadro 13 - Resultados obtidos para os açúcares das amostras do campo 19C analisadas com antrona, ao longo de quatro datas de colheita

	Simples	Complexos	Totais
Data 2	27,94	23,81	36,62
	29,82	31,32	37,39
	25,46	32,36	37,00
Data 3	36,61	21,62	38,32
	35,43	36,69	38,16
	37,47	27,82	38,30
Data 4	39,11	19,07	38,87
	40,11	21,93	37,22
	40,11	16,96	40,10
Data 5	36,53	20,46	37,42
	35,70	17,50	36,84
	78,82	9,53	80,69

Quadro 14 - Resultados obtidos para os açúcares das amostras do campo 19D analisadas com antrona, ao longo de quatro datas de colheita

	Simples	Complexos	Totais
Data 2	66,68	24,76	58,38
	57,29	33,96	67,31
	37,12	34,38	37,61
Data 3	37,76	38,86	18,94
	36,34	39,03	27,86
	37,06	38,46	38,25
Data 4	38,70	17,05	38,97
	38,47	26,25	37,91
	38,59	27,23	38,80
Data 5	36,64	16,47	33,64
	34,32	20,99	38,26
	34,57	20,70	36,48

ANEXO E – Resultados obtidos para a comparação dos teores de açúcares simples entre métodos

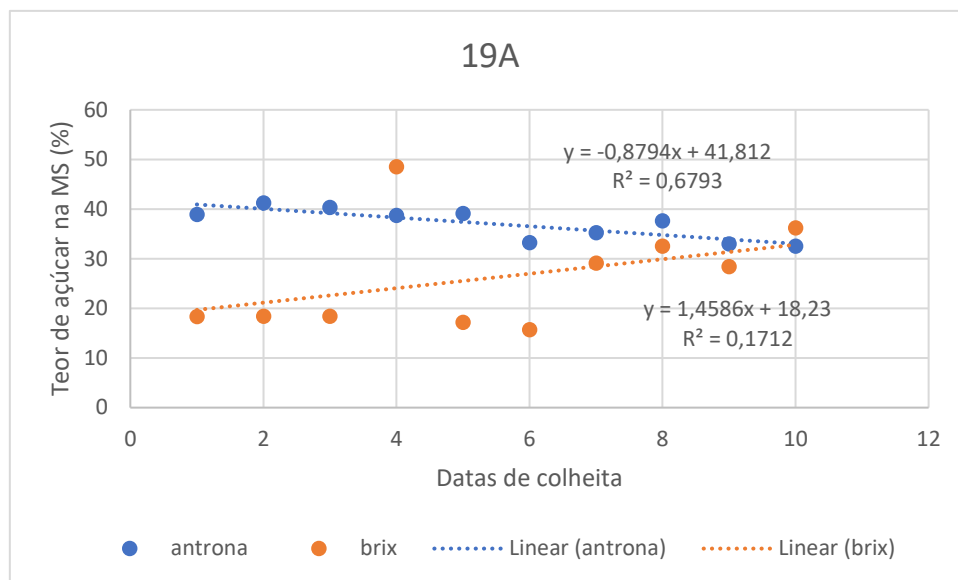


Figura 27 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e refratometria para a evolução do teor de açúcares simples nas amostras do campo 19A ao longo das datas de colheita.

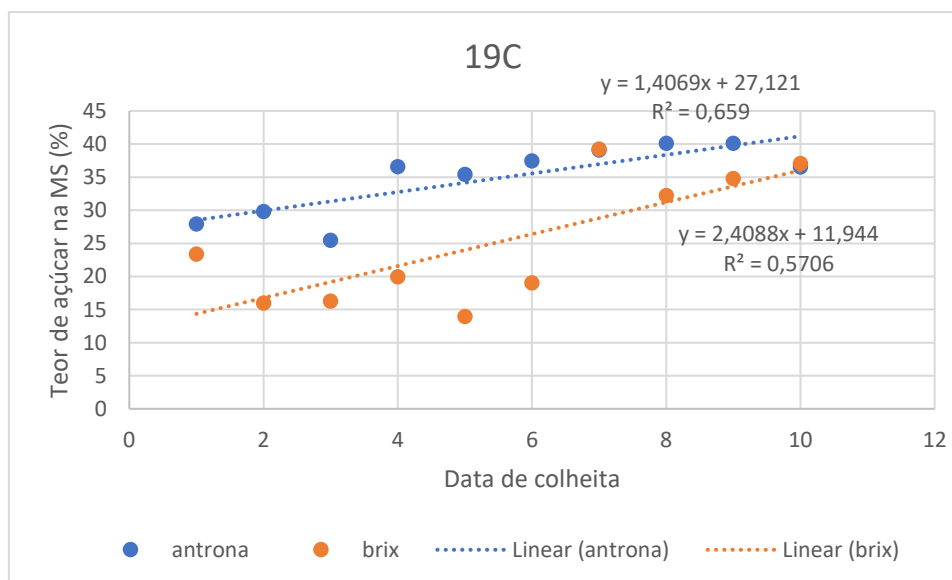


Figura 28 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e refratometria para a evolução do teor de açúcares simples nas amostras do campo 19C ao longo das datas de colheita.

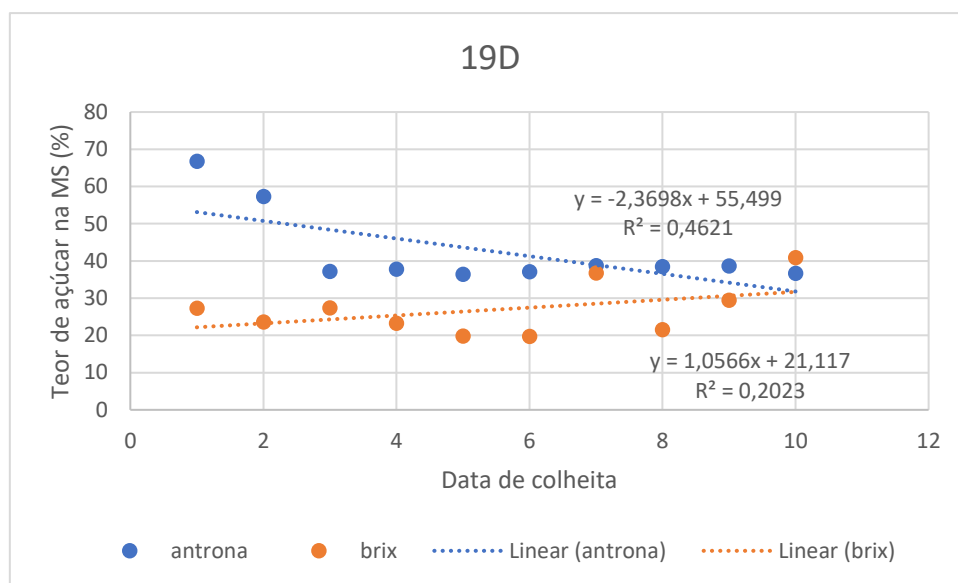


Figura 29 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e refratometria para a evolução do teor de açúcares simples nas amostras do campo 19D ao longo das datas de colheita.

ANEXO F - Resultados obtidos para a comparação dos teores de açúcares complexos entre métodos

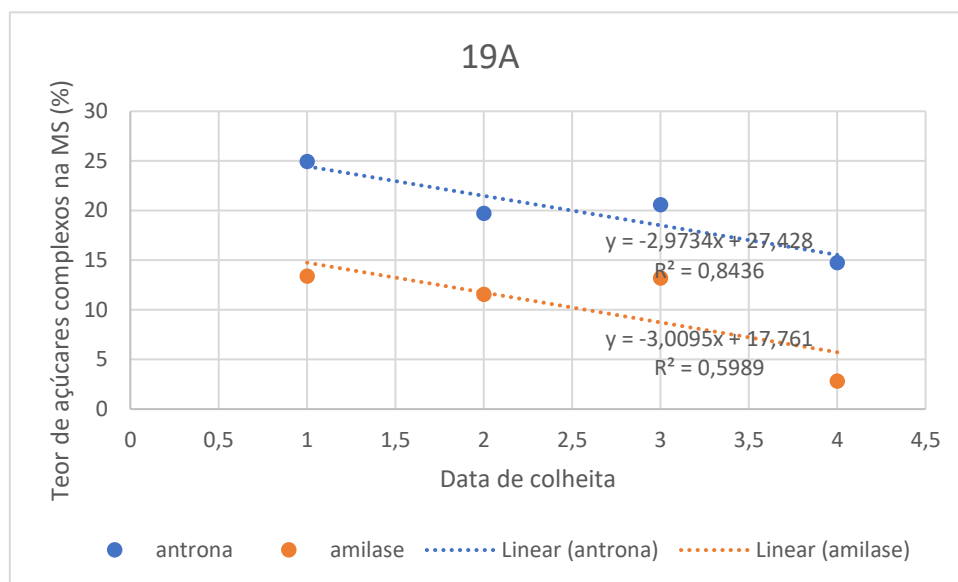


Figura 30 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e da digestão com a amilase para a evolução do teor de açúcares complexos nas amostras do campo 19A ao longo das datas de colheita.

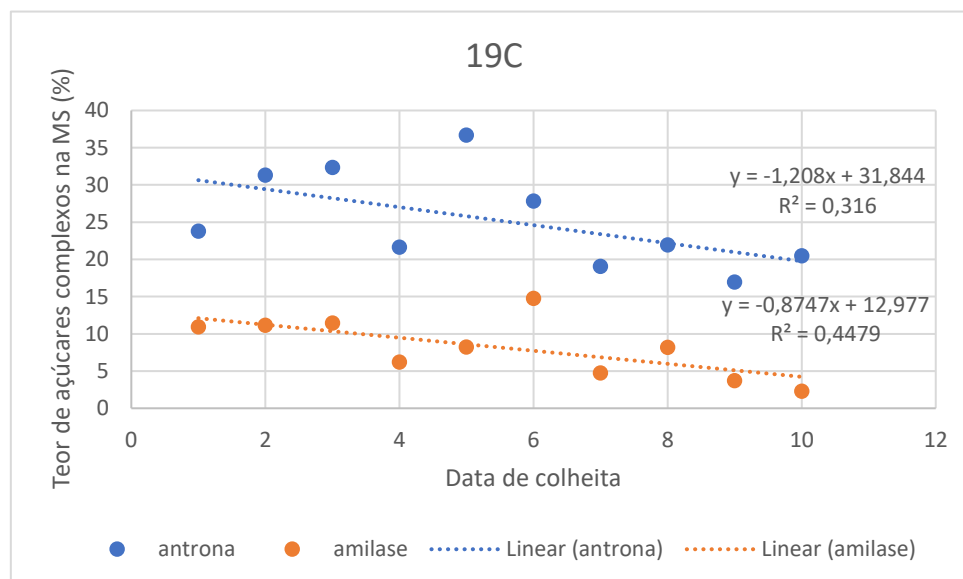


Figura 31 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e da digestão com a amilase para a evolução do teor de açúcares complexos nas amostras do campo 19C ao longo das datas de colheita.

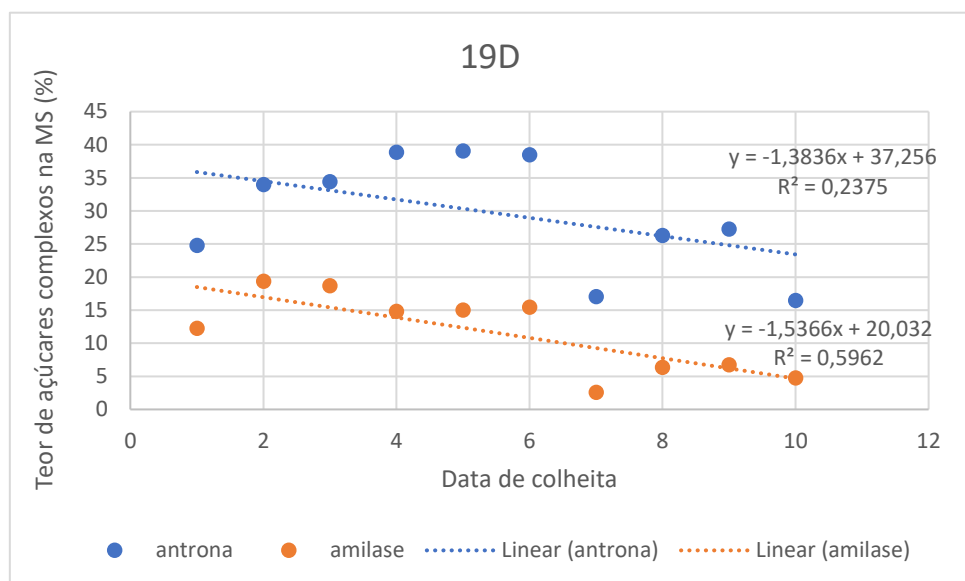


Figura 32 - Comparação entre os resultados obtidos por análise através do método da antrona e da digestão com a amilase para a evolução do teor de açúcares complexos nas amostras do campo 19D ao longo das datas de colheita.